

Pään ja kaulan alueen syöpien immunologiasta ja immunoterapiasta

Yunting Chen

Hammaslääketieteen kandidaatti

Helsinki 10.2.2019

Syventävien opintojen tutkielma

Ohjaaja: Tuula Salo, suupatologian professori

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Suu- ja leukasairauksien osasto	
Tekijä – Författare – Author Yunting Chen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Pään ja kaulan alueen syöpien immunologiasta ja immunoterapiasta			
Oppiaine – Läroämne – Subject Syövän immunologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Hammaslääketieteen lisansiaatin tutkielma	Aika – Datum – Month and year 10.2.2019	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 51	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Suomen Syöpärekisterin tilastojen mukaan pään ja kaulan alueen syöpien kuolleisuus on vuosina 1976 – 2016 pysynyt noin 35 % tasolla. Syöpähoitojen kehityksestä huolimatta kuolleisuudessa ei viime vuosikymmeninä ole tapahtunut merkittävää parannusta. Syöpähoidon tehon lisääminen perinteisten syöpälääkkeiden, kuten solusalpaajien tai sädehoidon annostusta nostamalla on rajallista, sillä ne lisäävät vakavia sivuvaikutuksia ja ovat toksisia. Immunoterapian lääkkeiden sivuvaikutukset ovat vähäisempiä ja niitä siedetään paremmin verrattuna perinteisiin syöpähoitoihin.</p> <p>Viime aikoina on ryhdytty kehittämään syövän immunoterapiaan liittyviä hoitoja, jolloin vaikutus kohdistuu tarkemmin syöpäsoluihin, ja sivuvaikutukset pysyvät kohtuullisella tasolla. Immunoterapian tavoitteena on stimuloida elimistön omaa vastustuskykyä hyökkäämään syöpäkudosta vastaan tehostamalla esimerkiksi T-lymfosyyttien toimintaa ja inhiboimalla immunitietin negatiivista säätelyä. Immunitietin negatiiviseen säätelyyn osallistuvat muun muassa tarkastuspisteinhibiittorit, joita ovat esimerkiksi CTLA-4 ja PD-1. CTLA-4:n ja PD-1:n löytäjät, James P. Allison ja Tasuku Honjo, saivat löydöksestään vuoden 2018 Nobelin fysiologian tai lääketieteen palkinnon. Tulevaisuudessa uusilla syövän immunoterapian muodoilla odotetaan saatavan apua myös pään ja kaulan alueen syöpien hoitoon vähentäen niihin liittyvää kuolleisuutta.</p> <p>Tutkielmani on kirjallisuuskatsaus, jossa esittelen immunomodulaation periaatteita ja kuvailen immunologiin menetelmiin perustuvaa pään ja kaulan alueen syöpien terapiaa viimeaikaisen kansainvälisen tieteellisen kirjallisuuden pohjalta. Tietolähteinä käytettiin pään ja kaulan alueen syöpiin liittyviä kansainvälisiä sekä kotimaisia julkaisuja ja tutkimuksia. Soveltuvin osin kerron myös muiden syöpien immunologisen hoidon löydöksiä ja tutkimustuloksia.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords pään ja kaulan syöpä, pään ja kaulan levyepiteelikarsinooma, immunologia, immunoterapia, monoklonaalinen vasta-aine			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston kirjaston tietokanta HELDA			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

Lyhenneluettelo	1
1 Johdanto	1
1.1 Tutkimuksen tavoitteet	3
2 Syövän immunologian perusta	3
2.1 Immuunivalvonta	3
2.2 Immunitetin muokkaus	5
3 Pään ja kaulan levyepiteelikarsinooman immunologiasta	5
3.1 Immuunijärjestelmän ohittaminen ja immunosuppressio	6
4 Syövän kasvua edistävän mikroympäristön muodostuminen	11
4.1 Sytokiinit.....	12
4.2 Immuunijärjestelmän sellulaariset komponentit kasvaimen mikroympäristössä	13
5 Papilloomavirukseen liittyvä pään ja kaulan levyepiteelikarsinooma	15
5.1 Immuuninohitus papilloomavirukseen liittyvässä pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa	15
5.2 Papilloomavirusspesifisen syövän ennaltaehkäisy immunologiaan vaikuttamalla.....	17
5.3 Immunoterapiahoitot jo syntyneessä pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomassa, johon liittyy papilloomavirus.....	18
6 Immunoterapian hoitomuodot pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa.....	21
6.1 Monoklonaaliset vasta-aineet	21
6.2 Immuunijärjestelmän tarkastuspisteet ja tarkastuspisteinhibiittorit.....	22
6.2.1 PD-1/PD-L1-signaalointireitti pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa.	23
6.2.2 Tarkastuspistereseptoreihin kohdistuvat monoklonaaliset vasta-aineet sektuksimabi-yhdistelmähoidossa.....	24
6.3 Kostimulatoriset agonistit	25
6.4 Immunoterapian yhdistäminen kliiniseen käytäntöön	26

7	Pään ja kaulan levyepiteelikarsinooman immunoterapia	29
7.1	Aiemmin hoitamattomat ja paikallisesti edennyt pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomat	29
7.2	Uusiutuvat ja metastasoivat pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomat.....	30
7.3	Tarkastuspisteinhibiittorit ja sädehoito	32
8	Johtopäätökset	35
	Lähdeluettelo	36

Lyhenneluettelo

5-FU	Fluorourasiili
AKK	Antigeenien käsittelykoneisto
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIP2A	<i>Cancerous inhibitor protein phosphatase 2A</i>
CTL	Sytotoksinen T-lymfosyytti
CTLA-4	Sytotoksisen T-lymfosyytin proteiini 4
DS	Dendriittisolu
EGF	Epidermaalinen kasvutekijä
EGFR	Epidermaalisen kasvutekijän reseptori
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
GM-CSF	Granulosyytti-monosyyttikasvutekijä
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
HLA	Ihmisen leukosyyttiantigeenit
HPV	Papilloomavirus
IFN	Interferoni
Ig	Immunoglobuliini
IL	Interleukiini
IMS	Intensiteetti moduloitu sädehoito
LAG-3	Lymfosyyttejä aktivoiva geeni 3
Mab	<i>Monoclonal antibody</i> , monoklonaalinen vasta-aine
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MSS	Myeloidiperäinen suppressorisolut
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-solu	<i>Natural killer cell</i> , luonnollinen tappajasolu
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PGE ₂	Prostaglandiini E ₂
PKLK	Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma
PLM	Patogeenihin liittyvät molekyylit

Englanninkieliset termit ovat kursivoitu. Jatkossa tutkielmassa esiintyvät englanninkieliset termit kursivoidaan.

SHP-2	Tyrosiinifosfataasi
SOC	<i>Standard of care</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophage</i> , kasvaimiin liittyvä makrofagi
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TGF- β	Transformoiva kasvutekijä beeta
TIL	Tuumoria infiltroiva lymfosyytti
TIM-3	T-solun immunoglobuliini ja musiinidomeeni 3
TIR	Tappajasolun immunoglobuliinin kaltainen reseptori
TLR	<i>Toll-like-reseptori</i>
TNF- α	Tuumorinekroositekijä alfa
Treg	Suppressiivinen regulatorinen T-solu
U/M PKLK	Uusiutuva ja metastoiva pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma
VEGF	Verisuonen endoteelin kasvutekijä
VKP	Viruksen kaltainen partikkeli
β 2M	β 2-mikroglobuliini

Englanninkieliset termit ovat kursivoitu. Jatkossa tutkielmassa esiintyvät englanninkieliset termit kursivoidaan.

1 Johdanto

Pään ja kaulan alueen syövillä tarkoitetaan huulten, suuontelon, nenän ja sen sivuonteloiden, nielun ja kurkunpään sekä suurten sylkirauhasten pahanlaatuista kasvainta lukuun ottamatta aivojen, silmien ja kilpirauhasen syöpää. Suurin osa pään ja kaulan alueen syöivistä ovat levyepiteelikarsinomia (1) ja niillä on taipumus metastasoida kaulan imusolmukkeisiin (2). Suurimmat riskitekijät ovat runsas alkoholin käyttö ja tupakointi ja riskiä lisää edelleen näiden yhtäaikainen suuri kulutus (3,4).

Suomen Syöpärekisterin tietojen mukaan vuonna 2016 Suomessa todettuja pään ja kaulan alueen syöpiä oli yhteensä 847 eli noin 2,5 % Suomen uusista syöpätapauksista. Pään ja kaulan syöpätaudin hakuvalintoina olivat huuli, kieli, suuret sylkirauhaset, muu tai määrittelemätön suusyöpä, nielu, kurkunpää, nenä ja nenän sivuontelot ja mukaan laskettiin sekä miehet että naiset. Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma (PKLK) on maailmanlaajuisesti kuudenneksi yleisin syöpä (3,4).

Syövän immunoterapian lähtökohtana on kasvaimen tunnistaminen elimistölle vieraaksi ja immuunijärjestelmä aktivoidaan hyökkäämään tätä kohdetta vastaan. Immunoterapiamuotoja ovat adoptiivinen T-solusiirto, rokotteet ja erilaiset monoklonaaliset vasta-aineet (Mab), joihin kuuluvat mm. tarkastuspisteinhibiittorit. Syvällinen ymmärrys immuunijärjestelmän häiriintyneestä kehityksestä ja puutteellisesta toiminnasta PKLK:n muodostumisessa parantaa syöpäpotilaiden saamaa hoitoa ja hoitotulosta.

Viime aikoina on uudelleen nostettu esille teoria, jonka mukaan immuunijärjestelmä tuhoaisi premalignit solut jo kehitysvaiheessa ennen kuin kasvain muodostuu (immuunivalvonta). Immuunipuolustuksen

häiriö tai syöpäsolun muuntuminen voi aikaansaada sen, että syöpäsolu kykenee välttämään immuunipuolustuksen (immuuninohitus) ja näin mahdollistaa syövän kehityksen.

PKLK hyödyntää sytokiinejä, kuten transformoivaa kasvutekijää beetaa (TGF- β) (5) ja interleukiinejä (esim. IL-6 (6) ja IL-10 (7)), suppressoidakseen soluvälitteistä antituumorista puolustusjärjestelmää. STAT1:llä (*signal transducer and activator of transcription 1*) on kasvainta suppreissoiva vaikutus ja PKLK:ssa STAT1 ekspressointi on vähentynyt. PKLK:n solut voivat välttyä antigeenivälitteisten sytotoksisten T-lymfosyyttien (CTL) tunnistukselta heikentämällä antigeenien käsittelykoneiston (AKK) komponentteja (immuunipako). Interferoni- γ (IFN- γ) lisää AKK:n toimintaa, mikä auttaa CTL:ä tunnistamaan ja hajottamaan PKLK:n soluja. STAT1:n aktivaatio on välttämätön AKK:n komponenttien ekspressiolle syöpäsoluissa. STAT1:n puutos heikentää IFN- γ -välitteistä AKK:n toimintaa ja vähentää syöpäsolujen tunnistamista CTL:n toimesta. (8,9) Poikkeuksellisesti inflammatoriset transkriptiotekijät, kuten NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ja STAT3, ovat aktivoitu PKLK-soluissa (10). Näitä transkriptiotekijöitä tutkitaan intensiivisesti mahdollisen terapeuttilähteen toivossa.

Syöpäsolujen kyky ohittaa immuunipuolustuksen valvonta ja välttyä tehokkaalta immuunipuolustukselta vaikuttaa suoraan kasvaimen kehityskulkuun. PKLK on immunosuppressiivinen tauti, joka alentaa lymfositien määrää suhteessa terveisiin verrokkeihin (11). Lisäksi luonnollisten tappajasolujen (*natural killer cell*, NK-solu) toiminta (12) sekä antigeenien esittely ovat heikentyneet (13). PKLK:ssa ja myös muissa syövyissä T-lymfosyytit toimivat vajavaisesti (14,15). Lisäksi on huomattu, että suppressiivisilla regulatorisilla T-soluilla (Treg) on yhteys PKLK:n ja muiden syöpien kehittymiseen (16,17). Treg erittävät suppressiivisiä sytokiinejä, kuten TGF- β ja IL-10, ekspressoivat

sytotoksisen T-lymfosyytin proteiini 4:ä (CTLA-4) ja ne korreloivat kasvaimen kehittymisen kanssa (18). Tämän takia immunomodulatoriset hoitomuodot, jotka pystyvät nujertamaan PKLK:n immunosuppressiiviset signaalit, ovat lupaavia hoitomuotoja.

Syöpärokote on yksi esimerkki immunoterapiasta. Rokote voi sisältää kasvaimen peptidien antigeeneja, virus-, bakteeri- tai DNA-rakenneosia. Näiden lisäksi rokote voi sisältää kasvainantigeenispesifisiä Mab:ta.

1.1 Tutkimuksen tavoitteet

Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli perehtyä immunoterapiaa käsittelevään kirjallisuuteen, kansainvälisiin tutkimustuloksiin ja immunoterapian tuomiin mahdollisuuksiin pään ja kaulan alueen syövän hoidossa. Tuon esille tällä hetkellä olevat immunoterapiaan käytetyt lääkkeet ja niistä saatavat hyödyt PKLK:n syövän hoidossa. Tutkielmassa ei käsitellä immunoterapian haittavaikutuksia ja niiden hoitoa tai ehkäisyä. Käytin tietolähteinä alan kirjallisuutta sekä julkaistuja kansainvälisiä tutkimustuloksia. Katsauksessa keskityn PKLK:an, mutta tähän on sisällytetty myös muiden syöpämuotojen relevantteja tuloksia.

2 Syövän immunologian perusta

2.1 Immuunivalvonta

Saksalainen lääkäri Paul Ehrlich kuvasi immuuniteetin ja karsinooman välistä vuorovaikutusta teoksessaan jo vuonna 1909 (19). Macfarlane Burnet ja Lewis Thomas esittivät 1950-luvulla hypoteesin syövän immuunivalvonnasta (20). Ajatuksena on, että potentiaalinen ”immuunipuhdistuma” (*immune clearance*) on

mahdollinen, mikäli syöpäsolun antigeeni eroaa selkeästi normaalista solusta. Menneinä vuosikymmeninä on saatu tutkimustuloksia, jotka ovat sekä immuunivalvonnan puolesta että vastaan. 1970-luvulla Burnetin tutkimuksessa hiiren transplantaatiomallissa tuumori aiheutti isännässä hyljinnän, kun taas normaalin kudoksen transplantaatio ei aiheuttanut reaktiota (21). Samana vuosikymmenenä todettiin, että hiiriltä, joilta on poistettu kateenkorva ja joilla on puutteellinen T-solutoiminta, ei kehittynyt huomattavasti enempää spontaaneja tai metyylikolantreenillä indusoituja syöpiä kontrolleihin verrattuna (22,23). Monet tutkijat hylkäsivät alussa ajatuksen syövän immuunivalvonnasta ristiriitaisten tutkimustuloksen takia ja asia jäi unohduksiin moneksi kymmeneksi vuodeksi, kunnes muutama avainlöydös nosti asian jälleen ajankohtaiseksi.

Ensiksi, Ronald Herberman löysi 1970-luvulla NK-solun, joka nähtävästi suojasi syövältä. Silloin huomattiin, että NK-solut pystyivät hajottamaan kasvainsoluja (24). IFN- γ :n löytyminen ja sen syövän kasvuun kohdistuva pro-apoptoottinen vaikutus antoi lisää tukea potentiaaliselle syöpäsolujen ”immuunipuhdistumalle” (25,26). Nyt tutkimuksilla on voitu osoittaa, että hiirille geneettisesti aiheutettu immuunipuutos altistaa sekä spontaanisti syntyvälle että kemiallisesti aiheutetulle kasvaimelle (27,28).

Potilailla, joilla on HIV-1 infektion aiheuttama immuunipuutos, on suurentunut riski saada papilloomaviruksen (HPV) aiheuttama pään ja kaulan syöpä (29,30). Lisäksi lääkkeellisesti immunosuppressoidut elinsiirtopotilaat ovat alttiimpia saamaan kasvaimia, jotka eivät ole viruksen aiheuttamia. Näitä kasvaimia ovat muun muassa keuhko-, pään ja kaulan, haima- ja muu endokriinisen järjestelmän ja paksusuolen syöpä sekä melanooma (31,32).

2.2 Immunitetin muokkaus

Syövän immuunimuokkaus on prosessi, jossa valikoituvat sellaiset kasvainsolut, jotka kykenevät välttämään immuunipuolustuksen. Syövän immuunimuokkauksen aikana kasvaimen kohtalo on riippuvainen isännän aktivoituvasta luontaisesta immunitetista ja hankinnaisesta immunitetista. Prosessin kulku jaetaan kolmeen vaiheeseen: eliminaatioon, tasapaino- ja pakenemisvaiheeseen (33). Ensimmäisessä vaiheessa, eliminaatiossa, immuunijärjestelmä tuhoaa muuntuneet solut. Ne kasvainsolut, jotka selviytyvät eliminaatiosta siirtyvät tasapainovaiheeseen, jossa tapahtuu ns. immuunimuokkaus. Kolmannessa ja viimeisessä vaiheessa, immunologisesti muokatut kasvainsolut kasvavat asteittain ja muodostavat immunosuppressiivisen mikroympäristön kasvaimelle. (33) Näin ollen kasvain voi kehittyä vain, mikäli se kehittää keinon välttyä immuunipuolustuksesta.

3 Pään ja kaulan levyepiteelikarsinooman immunologiasta

PKLK on aggressiivinen ja maligni sairaus, joka lähettää useasti etäpesäkkeitä kaulan imusolmukkeisiin (34). Arvioilta noin 888000 ihmistä sairastuu maailmanlaajuisesti pään ja kaulan alueen syöpiin vuonna 2018 (35). Suurimmat riskitekijät PKLK:ssa ovat tupakka ja alkoholi. HPV:n aiheuttamat PKLK:t luokitellaan yleensä erikseen niiden erilaisen patofysiologian, epidemiologian sekä hoitovasteen vuoksi. PKLK:n eloonjäämisaste on parantunut vain vaatimattomasti huolimatta hoitokeinojen parantumisesta; mm. kemoterapiassa, sädehoidossa, kirurgisessa tekniikassa sekä yhdistelmähoidoissa. Viiden vuoden eloonjäämisennuste PKLK-potilailla on noin puolet sairastuvista (36,37).

3.1 Immuunijärjestelmän ohittaminen ja immunosuppressio

Toimivan ja tehokkaan immunoterapian perustana on ymmärtää keinot, joilla kasvain pystyy välttämään immuunipuolustuksen. PKLK-solut pyrkivät alentamaan niiden omaa luontaista immunogeenisuutta (taulukko 1) ja tämän lisäksi ne suppressoivat aktiivisesti signaalireittejä 1-4 isännän antituumorisessa immuunivasteessa (Kuva 1) (36,38-40).

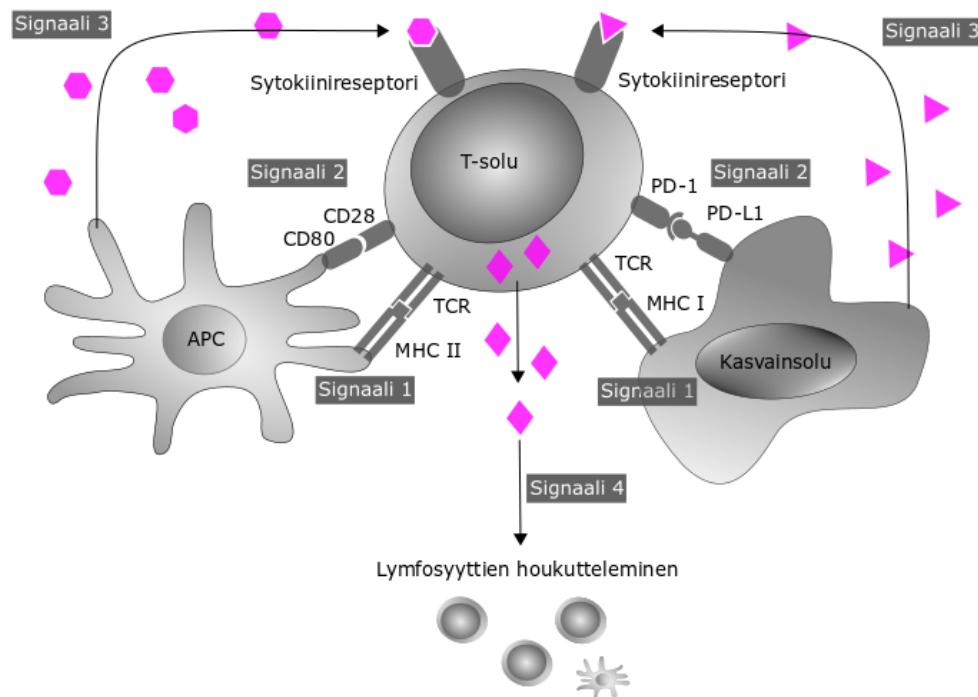
Immuunijärjestelmän solujen toiminta

Ihmisen leukosyyttiantigeenit (HLA) ovat avainasemassa, kun immuunijärjestelmä yrittää tunnistaa erilaisen tai muuntuneen solun. HLA-kompleksi esittää T-lymfosyyteille kasvaimen peptidejä. Kasvainsolu pystyy heikentämään T-soluvälitteistä immuunipuolustusta muuttamalla HLA I:n ekspressiota. (13)

Taulukko 1. Mekanismit, joita PKLK-solut hyödyntävät immuunijärjestelmän ohittamisessa

Antigeenien yliekspressointi tai mutatoituminen, johtaen toleranssiin T-soluja kohtaan pitkittyneessä HPV-infektiossa
Heikentynyt kasvaintantigeenien tunnistus
Lisääntynyt PD-L1 ekspressio HPV-positiivisessa tuumorissa
Lisääntynyt PD-1 ekspressio CTL:ssä
AKK-komponenttien downregulaatio tai mutaatio
Interferonin säätelytekijän downregulaatio ja STAT1 aktivaatio
STAT3 fosforylaatio ja aktivaatio
Inflammatoristen sytokiinien ja transkriptiotekijöiden inhibitio
Immunosuppressiivien sytokiinien määrän lisääntyminen (mm. IL-6, IL-10, TGF- β)
EGFR:n indusoima HLA:n downregulaatio tai mutaatio

Taulukko 1. Immuunipuolustuksen ohittaminen. Lyhenteet: AKK = antigeenien käsittelykoneisto, CTL = sytotoksinen T-lymfosyytti, EGFR = epidermaalisen kasvutekijän reseptori, HLA = ihmisen leukosyyttiantigeeni, HPV = papilloomavirus, IL = interleukiini, PD-1 = *programmed cell death protein 1*, PD-L1 = *programmed death-ligand 1*, PKLK = pään ja kaulan levyepiteelikarsinooma, STAT = *signal transducer and activator of transcription*, TGF- β = transformoiva kasvutekijä beeta. Mukailtu julkaisusta Ferris, R. L.: Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer (2015).



Kuva 1. Immuunijärjestelmän ja kasvainsolun vuorovaikutus. Jokainen signaalireitti voi olla potentiaalinen kohde immuunijärjestelmän ohittamiselle. Signaali 1: TCR ja HLA:n interaktio. Signaali 2: Kostimulatorinen/koinhibitorinen signaali. Vaste muodostuu näiden viestien summaatiosta. Signaali 3: Sytokiini-eritys, joka voi olla joko pro-inflammatorinen tyypin 1 antituumorinen välittäjäaine (Th1) tai kasvaimen kasvua suosiva tyypin 2 sytokiini (Th2). Signaali 4: Imusolujen houkutteleva paikalle kemokiinien ja inflammatoristen sytokiinien avulla, millä voi olla joko antituumorista immunitettia voimistava tai suppressoiva vaikutus. Lyhenteet: APC = antigeenin esittelijäsolu, CD = *cluster of differentiation*, HLA = ihmisen leukosyyttiantigeeni, MHC = *major histocompatibility complex*, PD-1 = *programmed cell death protein 1*, PD-L1 = *programmed death-ligand 1*, TCR = T-soluresptori. Mukailtu julkaisuista Ferris, R. L.: Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer (2015) ja Moy, Jennifer D.; Moskovitz, Jessica M.; Ferris, Robert L.: Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (2017).

Normaalissa solutoiminnassa proteiinit hajotetaan kahdella tavalla: 1) ubikitiini-proteasomi-reitin tai 2) lysosomaalisen reitin kautta. Karkeasti jaoteltuna lysosomaalisessa reitissä hajotetaan mm. fagosytoituja ekstrasellulaarisia proteiineja, jonka peptideistä muodostetaan HLA II-luokan molekyylin osasia (41). Ubikitiini-proteasomaalisessa reitissä hajotetaan puolestaan intrasellulaarisia proteiineja, joista tulee HLA I-luokan osasia (42). Ubikitinaatio on monimutkainen ja moniaskelinen prosessi, johon osallistuu kolme katalyyttistä entsyymiä. Normaalissa

tapauksessa ubikitinaatiossa syntyvät immunogeeniset peptidit päätyvät HLA I-luokan molekyyleiksi, jotka ovat vuorovaikutuksessa CD8⁺ T-solujen kanssa. Mikäli ubikitinaation toiminta häiriintyy kasvainsolussa, antigeenien esittely estyy, mikä johtaa kasvaimen antigeenien ja T-soluvälitteisen tunnistuksen heikkenemiseen ja vaikuttaa näin kasvaimen eliminoimiseen. (43) Lisäksi kromosomihäiriö (44) tai HLA/AKK:ta koodaavan geenin säätelyvirhe voi aiheuttaa HLA:n ja AKK:n toimintahäiriön (45) mikä on yhteydessä heikkoon prognoosiin (46,47).

Ilman HLA:ta olevat kasvainsolut kykenevät välttämään T-soluvälitteisen immuunipuolustuksen. Toisaalta tällaiset solut aktivoivat voimakkaasti NK-soluja, sillä HLA:n puuttuessa menetetään myös sen inhibitorinen vaikutus NK-soluihin (Kuva 2). (38) Näin ollen kasvainsolu siis hyödyntää monia tapoja välttääkseen immuunipuolustuksen, mutta ei kuitenkaan menetä kokonaan kykyä ekspressoida HLA:ta.

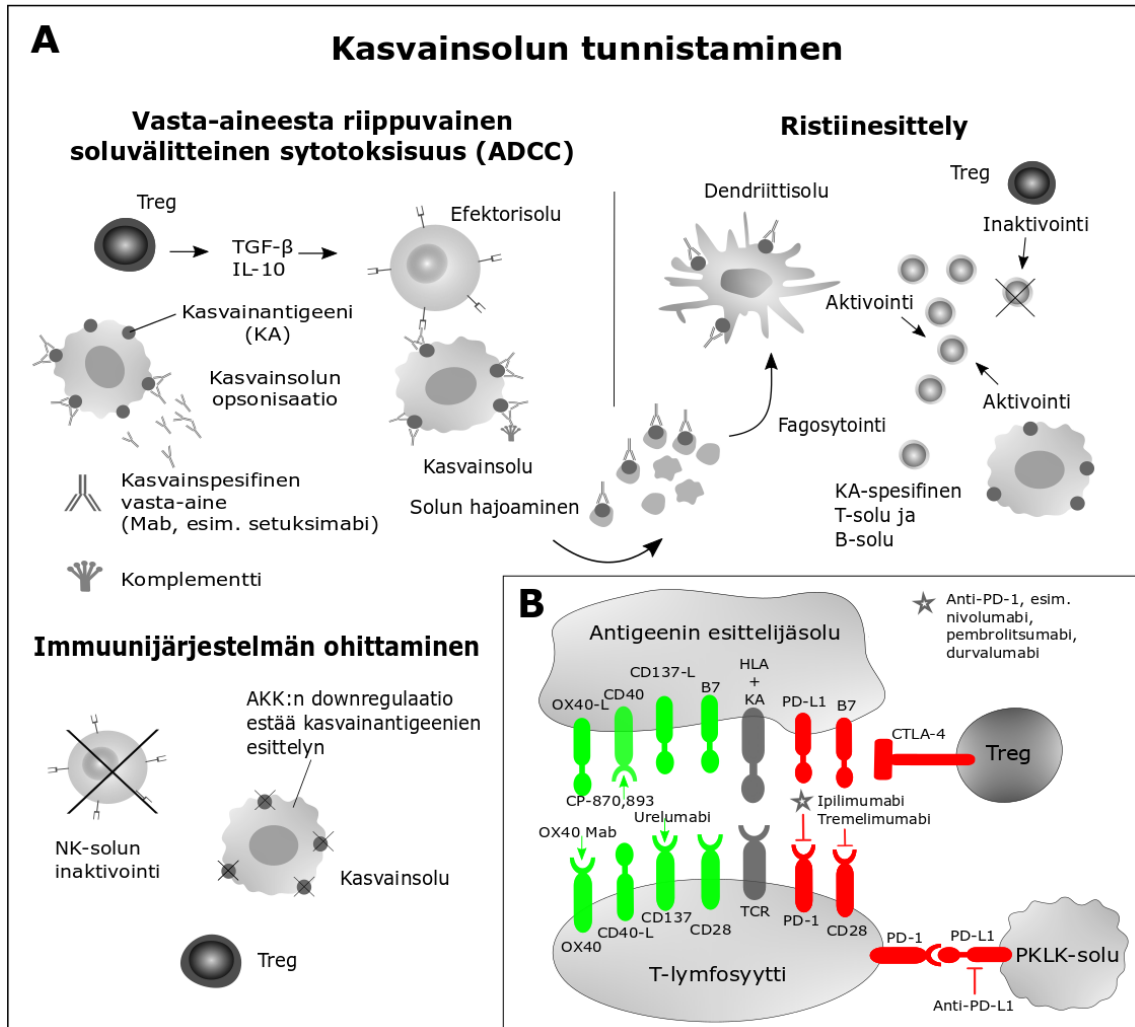
Endogeeniset antigeenit prosessoidaan ja hajotetaan peptideiksi proteasomeissa. Antigeeniset peptidit kuljetetaan endoplasmakalvostoon kantajaproteiinien avulla. Nämä kantajaproteiinit ovat osa AKK:on kuuluvia antigeenejä prosessoivia heterodimeerejä (TAP1, TAP2). Endoplasmakalvostossa antigeenit liittyvät HLA I-luokan vasta-aineen raskasketjuun (13). PKLK-solut, jotka ekspressoivat HLA I:tä ja kasvainantigeenejä, voivat välttyä T-solujen tunnistukselta vähäisemmän ekspression tai AKK-komponenttien mutatoitumisen takia. PKLK-solut ylläpitävät kuitenkin kohtalaista HLA I-ekspressiota välttääkseen NK-solujen aktivoitumisen.

Immunosuppressioon vaikuttaa EGFR:n ekspressointi ja mitogeeninen signaalointireitti. Tämän lisäksi immunosuppressioon vaikuttaa myös HLA:n ja AKK:n downregulaatio, STAT1:n aktivaatio, STAT3 signaalointireitti (39), sytokiinit ja ligandit PKLK-soluissa (taulukko 1).

Immuunijärjestelmän tarkastuspistereseptorit

Tutkimuksissa on noussut esille toinen tärkeä molekyyli-ryhmä; immuunijärjestelmän tarkastuspistereseptorit. Nämä ovat osa elimistön puolustusjärjestelmän säätelyjärjestelmää. Ne estävät immuunijärjestelmää ylireagoimasta ja toimimasta liian voimakkaasti normaalissa tulehdusvasteessa sekä estää autoimmuunireaktiota. Kasvainsolut hyödyntävät näitä jarrumolekyylejä selviytyäkseen mikroympäristössä. On tunnistettu monia reseptoreita, jotka esiintyvät toimintahäiriöisten lymfosyyttien pinnalla, mm. CTLA-4, lymfosyyttejä aktivoiva geeni 3 (LAG-3, CD223), T-solun immunoglobuliini ja musiididomeeni 3 (TIM-3) ja ohjelmoitu solukuolema -reseptori 1 (PD-1, programmed cell death 1) (40). Perineuraalisen levyepiteelikarsinooman ympäristöön on usein kertynyt T-soluja, jotka ekspressoivat PD-1, CTLA-4 ja TIM-3 ja joita ei havaita verestä johdetuista T-soluista (48). Näyttää siltä, että lymfosyytit voivat muuttua epätoiminnallisiksi kasvaimen mikroympäristössä.

B7 on ryhmä molekyyliä, jotka pystyvät sekä lisäämään että vaimentamaan immuunivastetta. Tutkimuksissa on osoitettu, että syövän mikroympäristössä inhibitorisen B7-molekyylien tuotanto on lisääntynyt, mikä lisää kasvaimen kykyä välttää immuunipuolustukselta (49). CD4+, CD8+ ja Treg esittelevät solupinnallaan B7-reseptoriryhmään kuuluvaa CTLA-4:ä, joka kilpailee CD28:n kanssa sitoutumisesta stimulatorisiin ligandeihin CD80 ja CD86 (50).



Kuva 2. (A) Monoklonaalisen vasta-aineen välittämä antituumorinen vaste kasvainsolun mikroympäristössä. Mab tunnistaa kasvainsolun pinnalla olevan KA:n ja sitoutuu siihen (opsonisaatio). Useat efektorisolut, mm. NK-solut, monosyytit, dendriittisolut ja muut granulosyytit, tunnistavat opsonisoituneen kasvainsolun. Efektorisolut aktivoituvat ja vapauttavat perforiinia ja grantsyymeja, mikä indusoi kasvainsolun solukuolemaa (ADCC). Kasvainsolun hajottua, dendriittisolut fagosytoivat solujätteen, joka muodostuu Mab-KA-kompleksista. Dendriittisolu prosessoi Mab-KA-kompleksin, jonka jälkeen se esittää T-soluille. (51) CTL tunnistavat sen ja eliminoivat kasvainsolun. Treg:t voivat downreguloida NK-solujen, dendriittisolujen sekä CTL:n toimintaa johtaen immuunipakoon. Lisäksi HLA ja AKK-komponenttien ekspressio PKLK:ssa vaikuttaa CTL-tunnistukseen ja sitä kautta immuunipakoon. (B) Kostimulatoriset (vihreä) ja koinhibitoriset (punainen) signaalit määrittävät antigeenispesifisen ärsyksen TCR:n kautta. TCR:n sitoutuminen HLA-KA-kompleksiin on välttämätön, mutta kuitenkin riittämätön TCR:n aktivoitumiseen. T-solun täydelliseen stimulaatioon tarvitaan kostimulatorinen signaali, joka välittyy TCR-koreseptorin (CD28) kautta. (52) T-solulla voi olla heikentynyt antituumorinen aktiveetti joko sisäisen suppressiivisen signaalin tai ulkoisesti Treg:n aiheuttaman suppressiivisen signaalin takia. (38) Lyhenteet: ADCC = vasta-aineesta riippuvainen soluvälitteinen sytotoksisuus, AKK = antigeenien käsittelykoneisto, CD = cluster of differentiation, CTL = sytotoksinen T-solu, CTLA-4 = sytotoksisen T-lymfosyytin proteiini 4, HLA = ihmisen leukosyyttiantigeeni, IL = interleukiini, KA = kasvaintantigeeni, Mab = monoklonaalinen vasta-aine, NK-solu = natural killer cell, luonnollinen tappajasolu, PD-1 = programmed cell death protein 1, PD-L1 = programmed death-ligand 1, PKLK = pään ja kaulan levyepiteelikarsinoma, TCR = T-solureseptori, TGF-β = transformoiva kasvutekijä beeta, Treg = suppressiivinen regulatorinen T-solu. Mukailtu julkaisusta Ferris, R. L.: Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer (2015).

LAG-3 on toinen reseptori, jonka on todettu tehostavan Treg:n toimintaa ja vaikuttavan negatiivisesti T-soluihin (53). TIM-3 on mukana monen syövän immuunisuppressiossa, mutta sen tarkkaa roolia PKLK:ssa ei täysin vielä tiedetä (54). TIM-3 immunosuppressiivisena markkerina tai välittäjäaineena on aktiivisen tutkimuksen alla. Tutkimukset ovat osoittaneet, että TIM-3 ekspressoinnin määrä korreloi huonojen kliinisten hoitotuloksien kanssa (55). TIM-3 blokkaminen anti-TIM-3-Mab:lla on osoittanut tehostavan antituumorista vastetta ja vähentävän Treg:n määrää PKLK:ssa (56). LAG-3 ja TIM-3 toiminnan ymmärtäminen edistää tulevan immunoterapian kehitystä.

4 Syövän kasvua edistävän mikroympäristön muodostuminen

Virchow huomasi ensimmäisenä yli sata vuotta sitten, että joidenkin syöpien synty korreloi kroonisten tulehduksien kanssa. Kasvainsolut pystyvät todennäköisesti hyödyntämään tulehdusvälittäjäaineiden infiltraatiota ja erilaisia sytokiineja, joita ovat mm. TGF- β , IL-6, IL-10, GM-CSF (granulosyytti-monosyyttikasvutekijä) (57,58), IL-1 β , IL-23, TNF- α ja kemokiini. Kemokiinit ovat ns. ”kemotaktisia sytokiinejä”. Kemotaksis kuvaa leukosyytin vaellusta tiettyyn suuntaan gradientin mukaisesti. Eri sytokiineilla on erilainen kemotaktinen ominaisuus ja sitä kautta erilainen vaikutus tiettyihin tulehduksellisiin sairauksiin (59). Nämä sytokiinit vaikuttavat suppressiivisten imusolujen muodostumiseen, kuten myeloidiperäisiin suppressorisoluihin (MSS), Treg:hin, kasvaimiin liittyviin makrofageihin (TAM) sekä muihin näihin soluihin vaikuttaviin tekijöihin. Kasvain pystyy hyödyntämään edellä mainittuja seikkoja ja näiden kautta vaikuttamaan mikroympäristön olosuhteisiin kasvaimen hyödyksi.

4.1 Sytokiinit

Tiedetään, että PKLK:n solut tuottavat immuunijärjestelmää suppressoivia sytokiinejä (60). TGF- β suppressoi NK- ja T-solujen aktivaatiota ja on avainasemassa Treg-solujen erilaistumisessa (61). IL-6 vaikuttaa STAT3:n kautta ja inhiboi dendriittisolujen kypsymistä sekä NK-solujen, T-solujen, neutrofiilien ja makrofagien aktivaatiota (62). IL-6 on havaittu korreloivan PKLK:n esiintyvyyden ja uusiutumisen kanssa (6). STAT3 on transkriptiotekijä, joka osallistuu useampaan immunosuppressiiviseen toimintaan, kuten IL-10 signalointiin (39), dendriittisolujen supressointiin, IL-12 downregulaatioon (63) ja Treg-solujen muodostumiseen (64).

Monet kasvaimet, kuten myös PKLK, tuottavat prostaglandiini E₂:ta (PGE₂), joka on kasvaimen selviytymistä, proliferaatiota ja invaasiota edistävä molekyyli (65,66). PGE₂:n säätelyyn saattaa vaikuttaa CIP2A (*cancerous inhibitor protein phosphatase 2A*) (67), joka PGE₂ tavoin edistää syövän kehittymistä. Runsas CIP2A:n ekspressio on yhteydessä kielisyövän heikkoon prognoosiin ja sitä voi mahdollisesti hyödyntää ennustettaessa kielisyövän etenemistä (68).

Angiogeneesin ensisijaisena promoottorina pidetään verisuonen endoteelien kasvutekijää (VEGF), joka on yliekspressoitu 90 % PKLK:ssa (69). VEGF lisää epäkypsien dendriittisolujen määrää kasvaimen mikroympäristössä, mikä ajatellaan johtavan T-solujen toimintahäiriöön ja inaktivaatioon (70). Toll-like-reseptorit (TLR) stimuloivat tulehdusta edistävien sytokiinien synteesiä, kuten esimerkiksi TNF- α ja IFN- γ , ja on yhteydessä T-solujen toimintaan (71,72).

4.2 Immuunijärjestelmän sellulaariset komponentit kasvaimen mikroympäristössä

Myeloidiperäiset suppressorisolut (MSS)

MSS ovat nimensä mukaisesti peräisin myeloidisesta solulinjasta, joita ovat useita erilaisia (73). MSS suppressoivat vastustuskykyä. Syöpäpotilailla on havaittu kohonnut MSS-määrä ja myös PKLK sisältää runsaasti näitä soluja (CD34+) (74). Kohonnut MSS-määrä on todettu vaikuttavan haima-, ruokatorvi- sekä mahasyövän ennusteeseen (75). Tutkimukset ovat osoittaneet, että CD34+ suppressoivat T-solujen toimintaa PKLK:ssa (76,77). Tämän lisäksi MSS tuottavat typpioksidia ja reaktiivisia happiyhdisteitä, jotka katalysoivat T-solureseptoreiden nitrausta (73). Tämä inhiboi taas T-solureseptoreiden ja HLA:n vuorovaikutusta, signalointia sekä myöhempiä aktivaatiota. Menetelmät kuten vasta-aine-depleetio (78), retinoiinihappo (79), gemsitabiini (80) ja STAT3:n esto (81) vähentävät MSS:jen määrää, voimistavat immuunivalvontaa, lisäävät T-solujen aktivaatiota sekä parantavat immunoterapian tehokkuutta. Tyypillisesti MSS:jen määrä kasvaa vanhetessa. Tämän seurauksena kroonisten tautien sekä syövän esiintyvyys kasvaa ikääntyessä (82).

Regulatoriset T-solut (Treg)

On tunnistettu pieni joukko autoimmuunireaktiota ehkäiseviä, nk. suppressorisia Treg-soluja. Nämä CD4+ T-solujen alajoukot ekspressoivat CD25, CTLA-4 ja CD39 (83). Treg:t edistävät syövän kehitystä aiheuttamalla anergiaa, apoptoosia sekä katkaisevat aktivoituneen T-solun solusyklin IL-10, TGF- β sekä suoran soluvälityksen kautta (84). Ne inhiboivat myös dendriittisolujen, NK-solujen ja B-solujen toimintaa (85). PKLK-potilailla on löytynyt enemmän Treg-soluja verenkierrosta, ja tämä lisää Treg-solujen todennäköisyyttä tunkeutua kasvaimeen aiheuttaen immunosuppressiota (17). Intratumoraaliset Treg-solut ovat kiertäviä

immunosuppressiivisempia (86). PKLK:ssa Treg:n määrä on kääntäen verrannollinen dendriittisolujen ja CD8+ T-solujen määrään (87,88). Tämän lisäksi PKLK-potilaiden hoidon jälkeen Treg:n ilmaantuvuus on lisääntynyt viitaten siihen, että syöpähoidot nostattavat niiden määrää (89).

Kasvaimen liittyvät makrofagit (TAM)

Kasvaimista löytyy monenlaisia puolustusjärjestelmän soluja, makrofagit mukaan lukien. TAM voivat erilaistua proinflammatoriseksi M1-fenotyyppiä tai vaihtoehtoisesti anti-inflammatoriseksi M2-fenotyyppiä (58).

TAM voi polarisoitua M1-tyypiksi IFN- γ :n vaikutuksesta. M1-fenotyypin makrofageilla on antituumorinen vaikutus. Ne ovat aktiivisia fagosyyttejä ja edistävät sytotoksista tulehdusvastetta tuottamalla IL-12 ja TNF:a (58). Gembisitinin on havaittu edistävän makrofagien polarisoitumista M1-fenotyyppiä (90).

Vaihtoehtoisesti TAM voi polarisoitua M2-fenotyyppiä IL-4:n ja IL-13:n vaikutuksesta, jolloin niistä tulee kasvaimia edistäviä makrofageja. M2-fenotyypin makrofagit ovat tulehdusta hillitseviä ja erittävät tulehdusta estävää IL-10. (58) Kasvaimet, joissa on runsaasti TAM korreloivat huonoimpien hoitotuloksien kanssa ja nämä ovat useasti juuri M2-fenotyyppiä. Näiden makrofagien on osoitettu tuottavan EGF, IL-6 ja IL-10, jotka liittyvät angiogeneesiin, kasvaimen progressioon ja etäpesäkkeisiin. (91) Erityisesti pahanlaatuisessa kasvaimessa TAM, jotka erilaistuvat M2-fenotyypin soluiksi ovatkin ns. ”protuumorisia makrofageja” ja edistävät sairauden kehittymistä. (92)

Näiden puolustusjärjestelmän solujen ja välittäjäaineiden kautta PKLK indusoi monin eri tavoin immunosuppreisoitua tilaa, mikä estää syövän immunoterapeuttisen hoidon. PKLK-potilaat ovat taipuvaisempia Th2-

fenotyypin T-soluille. Heillä voidaan todeta lisääntyntä Th2-aktiivisuutta ja kohonnutta IL-4, IL-6 ja IL-10 tasoja sekä samaan aikaan vähentyntä Th1:n sytokiinin IFN- γ :n tasoja. (93)

5 Papilloomavirukseen liittyvä pään ja kaulan levyepiteelikarsinoma

HPV-infektion on todettu olevan osallisena muissakin kuin kohdunkaulan syövässä (94). Maailman terveysjärjestön julkaisun World Cancer Report 2014 tietojen mukaan HPV-infektiota esiintyy yli puolella seksuaalisesti aktiivisilla ja tämä on lisännyt merkittävästi HPV-liittyvien PKLK:n esiintyvyyttä menneinä vuosikymmeninä. HPV:n esiintyy jopa neljänneksessä pään ja kaulan syövässä ja tästä yli 80 % on HPV 16 (95).

5.1 Immuuninohitus papilloomavirukseen liittyvässä pään ja kaulan levyepiteelikarsinomassa

HPV-infektio ja immuuninohitus HPV-liittyvissä syövässä on kliinisesti merkittävä mallintamismenetelmä immunoterapiatutkimuksissa. HPV:n vuorovaikutus IFN:n ja muiden soluviestintäreittien kanssa on keino, jolla kasvain pyrkii välttämään luonnollisen ja hankitun immunitetin (96). Antiviraalinen immuunivaste on riippuvainen tulehduksellisesta viestinnästä. Normaalissa virustulehdusvasteessa IFN yhdistää luontaisen immuunivasteen hankittuun immuunivasteeseen aktivoimalla epäkypsiä dendriittisoluja ja CD8+ T-soluja sekä tuottamalla virusspesifisiä vasta-aineita. (97) Viruksen infektoimat solut tuottavat interferoni-alfaa (IFN- α) ja interferoni-beetaa (IFN- β), joilla on immuniteettia stimuloiva vaikutus. Nämä käynnistävät antiviraalisen toiminnan inhiboimalla l-RNA:ta, aktivoimalla NK-soluja ja inhiboimalla virusproteiinien ekspressiota. (98) IFN- γ aktivoi leukosyyttien migraatiota, vasta-aineiden

esittelyä ja tulehdusvastetta. Ne ovat pääosin lymfosyyttien tuottamia. Niin sanotut ”patogeeneihin liittyvät molekyylikuviot” (PLM) ovat tärkeitä tekijöitä luonnollisen immunitetin tunnistusprosessissa. HPV:n virioni on potentiaalinen PLM, joka pystyy laukaisemaan tulehdussolujen vaarasignaaloinnin solureseptoreiden, esim. TLR, kautta. (99) HPV vaikuttaa antigeenin esittelyyn ja alentaa hankitun immunitetin vastetta downreguloimalla STAT-signaalointia, estämällä IFN:n synteesiä, vaikuttamalla AKK:n toimintaan ja vähentämällä HLA I:n ekspressiota (97). HLA, TAP tai β 2M-antigeenien käsittelyssä tai esittelyssä voi olla geenivariaatiota noin 10 – 12% geeneistä (100). Isännän geneettinen monimuotoisuus sekä geenimutaatiot voivat lopulta olla este onnistuneelle immunoterapialle näillä potilailla.

Normaalissa puolustusjärjestelmän toiminnassa tarkastuspistereseptorit, kuten PD-1 tai CTLA-4, rajaavat liian voimakkaasti toimivaa immuunivastetta ja suojaavat näin autoimmuunireaktiolta (101). PKLK-potilailla on kohonnut PD-1:n määrä HPV-infektoituneissa CD8⁺ T-lymfosyyteissä. Kuitenkin potilailla, joiden T-solut ekspressoivat korkeita määriä PD-1, on yllättäen parempi viiden vuoden eloonjäämisprosentti (93,3 %) verrattuna potilaisiin, joiden T-solujen PD-1-ekspressointi on matalalla (63,6 %). (102) Tämä mahdollisesti ristiriitainen havainto voi liittyä laajempaan antituumorisen immuunivasteen kokonaisuuteen, sillä proinflammatorinen tila voi stimuloida PD-L1:n ekspressiota (38). Toisaalta PD-L1:n ekspressio kasvainkudoksessa ei korreloi kliinisten tuloksien kanssa (102). Näin ollen näyttää siltä, että antituumorinen immuunivaste määräytyy kasvaimen lymfosyyttien määrän ja laadun mukaan. Emma V. Kingin vuoden 2014 tutkimus osoittaaakin, että kasvainlymfosyyttien määrä korreloi HPV-positiivisen suusyövän ja sen ennusteen kanssa (103). Samoin myös toisessa tutkimuksessa osoitettiin, että kasvainlymfosyyttien, mm. Treg:n, määrä on noussut HPV-positiivisessa suun alueen levyepiteelikarsinoomassa (102). Epäselvää on, miksi HPV-

positiivisilla PKLK-potilailla on parempi prognoosi verrattuna HPV-negatiivisiin PKLK-tapauksiin.

5.2 Papilloomavirusspesifisen syövän ennaltaehkäisy immunologiaan vaikuttamalla

Paras PKLK:n immunoterapiamuoto lienee HPV-rokote. Ennaltaehkäisevän rokotteen tavoitteena on estää virusinfektio ja syövän kehittyminen. Immunisaation kohteena on HPV:n L1-kapsidiproteiinit ja tähän käytetään viruksen kaltaisia partikkeleita (VKP). Nämä partikkelit käynnistävät humoraalisen vasta-ainetuotannon sekä soluvälitteisen immuunivasteen. Mielenkiintoista on, että VKP:lla aiheutettu immuunivaste tuottaa sata kertaa enemmän vasta-aineita kuin luonnollisen infektion seurauksena syntyy. (104)

Useammassa laajassa, lumekontrolloidussa, satunnaistetussa III-faasin kaksoissokkotutkimuksessa on osoitettu HPV-rokote tehokkaaksi sekä hyvän- että pahanlaatuisen HPV-liitännäisen kohdunkaulan syöpien ehkäisyssä (105,106). Esimerkiksi eräiden HPV-yhdistelmärokotteen (Gardasil® Merck & Co., VKP-tyyppiä 6, 11, 16, 18) tehokkuus on 96,8 % – 100 % ja HPV-bivalenttirokotteen (Cervarix® GlaxoSmithKline, VKP-tyyppiä 16, 18) 90,9 % – 100 % (106). Rokotteen vaikutusta suusyöpään ei olla vielä täysin arvioitu, mutta odotukset ovat korkealla ottaen huomioon tämän hetkiset antiviraaliset tutkimustulokset sekä HPV-positiivisten suusyöpien lisääntyneen esiintyvyyden. HPV-positiivista suusyöpää esiintyy iän myötä sekä naisilla että miehillä riippumatta ihmisrodusta tai etnisestä ryhmästä (107,108). Satunnaistetussa, lumekontrolloidussa Costa Ricalaisessa kohorttitutkimuksessa GlaxoSmithKlinen rokotteen saaneilla todettiin suun alueen HPV-infektion vähentyneen huomattavasti, jopa hävinneen miltei kokonaan (109). Ryhmää seurattiin neljä vuotta rokotuksen jälkeen, jolloin todettiin, että HPV-tyypin 16/18 -rokotteen saaneilla oli paljon alhaisempi HPV-

infektion esiintyvyys. Tulos viittaa siihen, että rokote antaa voimakkaan suojan myös suun kautta tulevaa HPV-infektiota vastaan, jolla voi olla merkittävä vaikutus HPV:n indusoivan suusyövän ehkäisyssä.

HPV-rokote pystyy ehkäisemään primaarisen virusinfektion, sillä ennaltaehkäisevän rokotteen indusoiman L1 kapsidivasteen vasta-ainetuotanto on moninkertainen verrattuna luonnollisen infektion aiheuttamaan vasteeseen. Mikäli solu on jo HPV-infektoitunut, sen DNA:han on integroitunut virus-DNA:ta ja solu alkaa ekspressoimaan intrasellulaarista E6 ja E7 -onkogeneeniä samalla kuin L1:n ekspressiokyky menetetään. Näin ollen HPV-rokotteet ovat tehottomia sekundaarisen HPV-infektion ehkäisyssä eivätkä ne sovi hoitomuotona HPV:ta sisältäviin syöpiin.

5.3 Immunoterapiahoidot jo syntyneessä pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomassa, johon liittyy papilloomavirus

Useat kehitteillä olevat PKLK:n rokotteet ovat tähän mennessä tuottaneet vaatimattomia tuloksia. Peptidirokotteet sisältävät syntetisoituja peptidejä, jotka ovat suunniteltu vastaamaan kasvaimen pinnalla olevaa antigeenideterminanttia (epitooppi), joka sitoutuu tehokkaasti HLA-molekyylisiin. Ne ovat samantyyppisiä kuin DNA-rokotteet; turvallisia, taloudellisia ja immunogeenisuudeltaan alhaisia. Näiden varjopuolena kuitenkin on se, että niiden teho rajoittuvat vain tiettyyn HLA-alaluokkaan (alleeli), jonka mukaan rokote on suunniteltu. Tutkimuksen alla olevia rokotteita PKLK:n hoitoon on esitetty taulukossa 2.

Kasvainantigeenejä voidaan viedä elimistöön bakteeri- tai virusrokotteilla. Nämä käynnistävät elimistössä immuunivasteen, jolloin rokote toimii samanaikaisesti myös immuunivastetta voimistavana adjuvanttina. Useampi tämänkaltaisia rokotteita on kehitteillä esim. HPV 16 E7 -listeriarokote (ADXS11-001) (110) ja onkolyyttinen vacciniavirusrokote (111). Kliinisiä tutkimuksia HPV-rokotteista PKLK

hoitoon on esim. melanooma-antigeeni (MAGE-A3) ja HPV 16 -peptidirokote (NCT00257738), aiemmin mainittu ADXS11-001 (NCT02002182) sekä DPX-E7 (NCT02865135). PKLK:ssa on havaittu olevan suuria määriä MAGE-A3 ja HPV 16, ja rokotteella pyritään stimuloimaan antigeenispesifisiä CD4+ ja CD8+ T-soluja. ADXS11-001-rokotteessa on heikennettyjä listeria monosytogenes -patogeeneja. Rokotuksen jälkeen listeria ilmentää HPV 16 E7 -antigeenia ja aktivoi CTL:n. DPX-E7-rokote on tarkoitettu HPV 16 PKLK:n hoitoon ja se saa aikaan antituumorisen vasteen tuottamalla CD8+ T-soluja.

Toinen merkittävä immunoterapiahoitomuoto pään ja kaulan alueen syövässä on adoptiivinen T-solusiirto. Ensin potilaalta eristetään T-soluja, jotka muutetaan geneettisesti tai niiden aktivaatiota parannetaan vaikuttavalla aineella. Tämän jälkeen T-solut siirretään takaisin potilaaseen. Tämän tavoitteena on tehostaa immuunijärjestelmän antituumorista vastetta. Adoptiivisesta T-solusiirrosta PKLK-potilaiden hoidossa on useampi tutkimus käynnissä. Esimerkkinä Yhdysvaltain kansallisen syöpäinstituutin tutkimus (faasi II) tuumoria infiltroivista lymfosyyteistä (TIL) HPV-liittyvissä syövässä, mukaan lukien PKLK (NCT01585428) sekä tutkimus (faasi II) autologisista TIL:stä uusiutuvissa/metastasoivissa PKLK:ssa (NCT03083873).

Dendriittisolut (DS) ovat potentiaalisimpia antigeenispesifisten T-solujen aktivoijia. Dendriittisolurokotteet ovat solutuotteita, jotka tuotetaan ex vivo -menetelmällä eli ne eristetään potilaalta, jonka jälkeen niihin siirretään kasvainantigeeneja. Antigeeneiksi sopivat mm. peptidit, proteiinit, DNA-transfektio, kasvainsolun hajoamistuotteet, apoptoottinen tai nekroottinen kasvain. DS maturoitumisen ja aktivaation jälkeen, DS siirretään takaisin potilaaseen, yleensä suoraan kasvaimeen tai imusolmukkeeseen. PKLK:n DS-rokotteista on olemassa joitakin tutkimuksia. Esimerkiksi satunnaistettu I faasin tutkimus p53-

peptidispesifisestä DS-rokotteesta on saatu lupaavia klinisiä tuloksia (NCT00404339) (112).

Taulukko 2. Tutkimuksen alla olevat rokotteet pään ja kaluan alueen syövän hoitoon					
Rokote	Tyyppi	Sairaus	HPV-status	Faasi	Tutkimus-tunniste
MAGE-A3 + HPV-16 -rokote	Peptidirokote, VLP-rokote	PKLK	+	I	NCT00257738
Mutant p53 peptide pulsed dendritic cell vaccine	DC-solu + peptidi	PKLK	+/-	I	NCT00404339
AlloVax™	Kasvain-antigeeni-rokote	U/M PKLK	+/-	II	NCT01998542, NCT02624999
ADXS11-001 (ADXS-HPV)	Lm-rokote	OS	+	II	NCT02002182
MEDI0457 (INO-3112)	DNA-rokote	PKLK	+	II	NCT02163057
poly ICLC	RNA-rokote	Kiinteä PKS	+/-	II	NCT02423863, NCT01984892
Anti-MUC1	Musiinirokote	U PKLK	+/-	II	NCT02544880
DPX-E7 rokote	Peptidirokote	OS	+	II	NCT02865135
CIMAvax	Peptidirokote	PKLK	+/-	II	NCT02955290
MVX-ONCO-1	Kasvainsolu-rokote	PE PKLK	+/-	-	NCT02999646
MEDI0457	DNA-rokote	PKS	+	II	NCT03162224
TG4001	Virusrokote	U/M PKLK	+	I/II	NCT03260023
ADXS-NEO	Lm-rokote	M PKS	+/-	I	NCT03265080
RO7198457	RNA-rokote	PE/M PKS	+/-	I	NCT03289962
VB10.NEO	DNA-rokote	PE/M PKS	+/-	II	NCT03548467
YE-NEO-001	Hiivarokote	PKLK	+/-	I	NCT03552718
FIt3L	Proteiinirokote	PKLK	+/-	II	NCT03789097

Taulukko 3. Lyhenteet: DC = dendriittisolu, HPV = papilloomavirus, Lm = *Listeria monocytogenes*, M = metastasoiva, MAGE-A3 = *Melanoma-associated antigen 3*, OS = orofaryngeaalinen syöpä, PE = paikallisesti edennyt, PKLK = pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoma, PKS = pään ja kaulan alueen syöpä, U = uusiutuva, VLP = viruksen kaltainen partikkeli.

6 Immunoterapian hoitomuodot pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa

6.1 Monoklonaaliset vasta-aineet

Mab:t ovat eniten käytetty syövän immunoterapiamuoto (51). Mab:n kohteena ovat mm. kasvainantigeenit, sytokiinit, TNF-reseptoriperhe ja immuunijärjestelmän tarkastuspisteet. Tällä hetkellä tutkimuksen alla olevat PKLK:n Mab:t ovat listattuna taulukossa 3. Näistä eniten tutkittu ja Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (FDA) hyväksymä lääke, jota käytetään PKLK:n hoidossa, on setuksimabi. Setuksimabi on ihmisen ja hiiren kimeerinen immunoglobuliini G1 (IgG1) ja se on EGFR inhibiittori (113). EGFR on houkutteleva kohde PKLK:ssa sillä se on tutkimuksien mukaan yliekspressoitu 80 – 90 % PKLK-tapauksissa (114). EGFR johtaa kasvainsolujen proliferaatioon, invaasioon, angiogeneesiin sekä vaikuttaa kasvaimen selviytymiskykyyn ja näin ollen potilaan prognoosiin (115).

Sami S. Khaznadarin vuoden 2018 tutkimuksessa esitetään toisin EGFR:n ekspressoinnista. Sami S. Khaznadar esittää, että EGFR:n yliekspressio ei ole yleinen PKLK:ssa ja EGFR:n ekspressiotaso ei yksinään ennusta erlotinibin (tyrosiinikinaasi-inhibiittori eli TKI, EGFR-inhibiittori) lääkevastetta. Vain sellaiset solut tai kasvaimet, joissa on aktivoiva EGFR-mutaatio, ovat riittävän herkkiä reagoimaan kliinisesti saavutettaviin TKI-pitoisuuksiin. (116) Tästä syystä EGFR:n ekspressiotasolla ei voida yksinään ennakoida lääkevastetta. EGFR-inhibiittoreiden teho PKLK:n hoidossa vaatii lisätutkimuksia.

Anti-EGFR-Mab välittää kasvaimen kohdistetun antigeenispesifisen immuunireaktion kahdella tavalla (Kuva 2). Yksi näistä on kasvainsolujen suora tappaminen lyyttisten imusolujen toimesta (NK-solu tai

monosyytti). Toinen on komplementin aktivoituminen tai kasvaimen opsonisaatio fagosytoosia varten. Toiseksi mainittu mekanismi indusoi kasvaintangeenispesifisiä CLT:ä tunnistamaan ja hajottamaan kasvainsoluja. Suorin menetelmä, jolla vasta-aine voi aiheuttaa kasvaimen hajoamisen on vasta-aineriippuvaisen soluvälitteisen sytotoksisuuden (ADCC) avulla. ADCC:tä välittää NK-solut ja mahdollisesti myös monosyytit ja neutrofiilit (117). Vasta-aineriippuvaisen soluvälitteisen sytotoksisuuden laajuus on vahvasti riippuvainen FcγRIIIa (CD16) geneettisestä polymorfismista (118). Tästä ei kuitenkaan ole tarpeeksi kliinistä tietoa PKLK-potilaiden keskuudessa. Kasvaintangeenispesifiset Mab:t voivat saada CD8+ T-soluissa vasteen kasvaimen antigeeneille vuorovaikuttamalla FcγR-omaavien antigeeniä esittelevien solujen kanssa. Tämä antigeenispesifinen T-soluaktivaatio on huomattu 78 % rintasyöpäpotilaissa, joita on hoidettu trastutsumabilla ja aktivaatio näyttää korreloivan positiivisesti kliinisen vasteen kanssa (119). Spesifistä T-soluaktivaatiota on havainnollistettu PKLK-potilaiden hoidossa, johon on käytetty setuksimabia joko yksinään tai kombinaatiohoidossa yhdessä sisplatiini-kemoterapian kanssa (120). Laajan setuksimabi-tutkimuksen lisäksi myös duligotutsumabi (MEHD7945A) PKLK:n hoitoon on faasi I ja II tutkimuksen alla (NCT01577173, NCT01911598). Duligotutsumabi on kaksoisvaikutteinen Mab, joka on sekä anti-HER3 että anti-EGFR (121).

6.2 Immuunijärjestelmän tarkastuspisteet ja tarkastuspisteinhibiittorit

T-solun aktivaatio muodostuu vaikuttavan tekijän sitoutumisesta T-solureseptoriin ja kostimulatorisesta signaalista. Immuunijärjestelmän tarkastuspisteet säätelevät immuunivasteen voimakkuutta ja kestoa, kuten esimerkiksi infektiossa tämä inhibitorinen signaalireitti ehkäisee liiallista tulehdusvastetta sekä autoimmuunireaktiota. Tarkastuspisteillä on merkittävä rooli kasvaimen mikroympäristössä. Tarkastuspisteligandeja

ja -reseptoreita estämällä voidaan aktivoida antituumorinen T-soluvaste kasvaimen mikroympäristössä (122). Ligandien ja reseptoreiden vuorovaikutus säätelee tarkastuspisteiden toimintaa, esimerkiksi CTLA-4:n ligandina toimii CD80 ja CD84, PD-1:n ligandina toimii PD-L1 ja PD-L2. Vuoden 2018 Nobelin fysiologian tai lääketieteen palkinnon saivat James P. Allison ja Tasuku Honjo, jotka löysivät vastaavasti CTLA-4:n ja PD-1:n.

CTLA-4:n inhibitorisen vaikutuksen estäminen on havaittu johtavan kasvaimen hyljintään (123). Edenneen melanooman hoidossa käytetty CTLA-4-vasta-aine ipilimumabi on ensimmäinen lääke, joka osoitti kliinistä hyötyä ja sai FDA:n hyväksynnän (124). Toinen CTLA-4-vasta-aine on tremelimumabi.

PD-1-vasta-aineella on myös havaittu olevan kliinistä tehoa yksinään (40) tai yhdessä ipilimumabin kanssa (125). Nivolumabin (PD-1-vasta-aine) ja ipilimumabin yhdistelmähoidolla on saavutettu enemmän hoitovastetta edenneen melanooman hoidossa monoterapiaan verrattuna. Refraktorisessa PKLK:ssä on tällä yhdistelmähoidolla saavutettu täydellinen remissio neljän kuukauden hoidolla. (125) Menetelmää ei voida kuitenkaan käyttää kaikkien potilaiden kohdalla sen korkean toksisuuden vuoksi.

6.2.1 PD-1/PD-L1-signaalintireitti pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa

PD-1 (CD279) on solun tyyppi I transmembraaniproteiini, joka kuuluu CD28-reseptoriperheeseen. CD28 ovat T-solun kostimulatorisia reseptoreita, joihin myös CTLA-4 kuuluu. PD-1 intrasellulaarinen osa koostuu proksimaalisesta ja distaalisesta osasta. Molemmat ovat tyrosiinipohjaisia reseptoreita, proksimaalinen osa toimii inhibitorisesti ja distaalinen osa toimii kytkimenä. Kaksi PD-1:lle spesifistä ligandia on

tunnistettu: PD-L1 (B7-H1, CD274) ja PD-L2 (B7-DC, CD273). PD-L1 ja PD-L2 on osoitettu downreguloivan T-solun aktivaatiota sitoutumalla PD-1:seen niin ihmisessä kuin myös hiirikokeissa. PD-1 välittää negatiivisen signaalin ja suppressoi antituumorista immunitetteetia rekrytoimalla tyrosiinifosfataasin (SHP-2) fosforyloituun tyrosiinikytkimeen ja tällöin ei saada aikaan toivottua antituumorista vaikutusta. PD-1 ilmenee ensisijaisesti aktivoiduissa T-soluissa, B-soluissa ja myeloidisissa soluissa. SHP-2:n ekspressio TIL:ssä on havaittu olevan korkeampi kuin ääreisverenkierron lymfosyyteissä. (126) PD-1 salpaaminen mahdollistaa T-soluaktivaation ja saa aikaan soluvasteen, mutta vaste on vaihteleva ja on riippuvainen eri isäntäsolun geneettisistä tekijöistä. Kasvain kykenee ohittamaan isännän immuunipuolustuksen, mikäli PD-L1:tä ekspressoidaan runsaita määriä ja/tai kasvaimeen infiltroituu PD-1-positiivisia T-lymfosyyttejä. Tutkimuksien mukaan PD-L1:tä ekspressoidaan jopa noin 80 % PKLK-tapauksista ja HPV-positiiviseen kasvaimeen saattaa tunkeutua enemmän PD-1-positiivisia Treg-soluja verrattuna HPV-negatiiviseen kasvaimeen. (40,127,128) Näin ollen PD-1:n inhiboiminen on potentiaalinen hoitomuoto PKLK:ssa.

6.2.2 Tarkastuspistereseptoreihin kohdistuvat monoklonaaliset vasta-aineet sektuksimabi-yhdistelmähoidossa

Setuksimabi muuttaa tarkastuspistereseptoreiden ekspressointia kiertävissä sekä intratumoraalisissa TIL:ssa. Erityisesti supressoivien Treg-solujen, jotka ekspressoivat CTLA-4 ja PD-1, määrä on lisääntynyt kasvaimen mikroympäristössä. Tämän lisäksi sektuksimabi lisää joidenkin Treg-solujen (mm. CD4+, CD39+) esiintyvyyttä, mikä viittaa siihen, että kyseinen lääke lisää näiden vaikutusta PKLK:ssä. PKLK-potilaiden CTLA-4 ekspressoivien solujen määrä kasvaa huomattavasti setuksimabin käytön jälkeen ja näin setuksimabi voi tehostaa CTLA-4:än kohdistuvan muun lääkkeen vaikutusta. (129) Nykytiedon mukaan EGFR:llä on vaikutus PD-1/PD-L1-singalointiin. Setuksimabin käyttö

lisää PD-1 TIL:n määrää, mikä korreloi käänteisesti setuksimabin hoitotuloksen kanssa (130).

Tarkastuspisteinhibitoriset Mab:t yhdistettynä tavanomaiseen PKLK-hoitoon voi olla tehokas hoitomuoto, esimerkkinä Treg-solujen depleetio tai suppressiivisen PD-1/PD-L1-signaalointireitin katkaiseminen, mikä normaalisti välittää suppressoivan viestin CD8+ T-lymfosyytille. Suppressoidut NK- tai T-solut ekspressoivat enemmän negatiivista säätelijää, PD-1-reseptoria, ja aiheuttaa näin voimakkaamman inhibitorisen signaalin TIL:ssä. Tämä antaa vahvan perustan parantavalle yhdistelmähoidolle, joka koostuu setuksimabista ja anti-PD-1-Mab:sta. Tämä olisi edistysaskel siinä, missä perinteinen sytotoksinen kemoterapia vahingoittaa myös hyödylliset antituumoriset lymfosyytit ja estää niiden toiminnan.

6.3 Kostimulatoriset agonistit

Lymfosyyttien negatiivisen säätelyn blokkauksen lisäksi kasvainlymfosyyttien toimintaan voidaan vaikuttaa myös toisella tavalla: tehostamalla ja käynnistämällä lymfosyyttien positiivinen säätely kostimulatorisella agonistilla, esim. agonistin tavoin toimiva vasta-aine tai pienmolekyylä. TNF-Mab PKLK:n hoitoon on faasi II tutkimuksen alla (TNFerade™). Koska kostimulatorinen säätely on merkittävä tekijä imusolujen aktivoinnissa, substansseja kuten CP-870,893 (immunoglobuliini G2, CD40-agonisti), OX40 Mab:a (immunoglobuliini G2, CD134-agonisti) ja urelumabia (immunoglobuliini G4, CD137-agonisti) tutkitaan aktiivisesti (131). TLR-agonistin (motolimodi) ja setuksimabin yhdistelmä indusoi dendriittisolujen maturaatiota ja ristiinesittelyä ja sen on osoitettu indusoivan NK-soluriippuvaista kasvainsolujen hajottamista (132). In vitro -kokeessa TLR stimulointi edistää M1-makrofagien muodostumista ja kumoaa MSS:jen T-soluihin kohdistuvan suppreisoivan vaikutuksen (133).

6.4 Immunoterapian yhdistäminen kliniseen käytäntöön

Yhdistettäessä uutta hoitomuotoa kliniseen käytäntöön on otettava huomioon PKLK-potilaiden taudin eri vaiheet sekä taudin levinneisyysaste sekä saman väestöryhmän eri yksilöllinen klininen tarve. FDA on hyväksynyt melanooman ja keuhkosyövän hoitoon tarkoitetut PD-1- ja CTLA-4-Mab:t. Näitäkin tutkitaan parhaillaan PKLK:n hoitoon. Vuonna 2014 Yhdysvaltain kansallinen syöpäinstituutti rahoitti PKLK:n klinisten kokeiden suunnittelukokouksen helpottaakseen immunoterapian faasin II ja III tutkimuksia PKLK:n hoidossa.

Taulukko 3. Tutkimuksen alla olevat lääkkeet pään ja kaulan alueen syövän hoitoon					
Lääke	Sairaus	HPV-status	Faasi	Tutkimus-tunniste	
Setuksimabi +/- IMC-A12	Preoperatiivinen PKLK-hoito	+/-	II	NCT00957853	
Fludarabiini + syklofosfamidi (adoptiivinen T-solusiirto)	OS	+	II	NCT01585428	
Lirilumabi + nivolumabi vs. lirilumabi + nivolumabi + ipilimumabi	Refraktorinen kiinteä kasvain	+/-	I/II	NCT01714739	
Ipilimumabi + setuksimabi + IMS	PKLK, luokat III-IVB	+/-	I	NCT01935921	
Relatlimabi vs. relatlimabi + nivolumabi	Kiinteä kasvain	+/-	I/II	NCT01968109	
Urelumabi + nivolumabi	Kiinteä kasvain	+/-	I/II	NCT02253992	
APX005M	Kiinteä kasvain	+/-	I	NCT02482168	
[18F]F-AraG PET Scan + anti-PD-1-hoito	PKLK	+/-	I	NCT03129061	
MEDI0562	Preoperatiivinen PKLK-hoito	+/-	I	NCT03336606	
Palbosiklibi (neoadjuvantti) vs. + kemosädehoito + pembosiklibi	PKLK	+/-	II	NCT03389477	
Fislatutsumabi +/- setuksimabi	Setuksimabi-resistenttinen U/M PKLK	+/-	II	NCT03422536	
Durvalumabi + sädehoito	PKLK	-	I	NCT03635164	
VX15/2503 +/- ipilimumabi +/- nivolumabi	PKLK, luokat I-IVA	+/-	I	NCT03690986	
Pitkälle edennyt pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoma					
Nimotutsumabi + SOC	Paikallinen	+/-	II	NCT00702481	
Lirilumabi + ipilimumabi	Kiinteä kasvain	+/-	I	NCT01750580	
Avelumabi + sädehoito + setuksimabi vs. SOC	Paikallinen	+/-	III	NCT02999087	
Pembrolitsumabi/lumevaikutus + kemosädehoito	Paikallinen	+/-	III	NCT03040999 / KEYNOTE-412	
Ad-p53 + nivolumabi	U PKLK	+/-	II	NCT03544723	

Durvalumabi + tremelimumabi + sädehoito	Paikallinen	+/-	II	NCT03624231
Pembrolitsumabi + sädehoito +/- sisplatiini	Paikallinen, luokat III-IVA	+/-	III	NCT03765918
Uusiutuva ja metastasoiva pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoma				
Doketakseli + sisplatiini +/- panitumumabi		+/-	II	NCT00454779
Kemoterapia +/- bevasitsumabi		+/-	III	NCT00588770
Duligotutsumabi vs. setuksimabi		+/-	II	NCT01577173
Kemoterapia + setuksimabi + VTX-2337		+/-	II	NCT01836029
Duligotutsumabi + kemoterapia		+/-	I	NCT01911598
Nivolumabi vs. setuksimabi/metotrekseatti/doketakseli		+/-	III	NCT02105636
Pembrolitsumabi vs. SOC		+/-	III	NCT02252042 / KEYNOTE-040
Durvalumabi vs. tremelimumabi vs. durvalumabi + tremelimumabi		+/-	II	NCT02319044
Patritumabi + setuksimabi + sisplatiini/karboplatiini		+/-	I	NCT02350712
Pembrolitsumabi vs. pembrolitsumabi + sisplatiini/karboplatiini + 5-fluorourasiili vs. setuksimabi + sisplatiini/karboplatiini + 5-fluorourasiili		+/-	III	NCT02358031 / KEYNOTE-048
Durvalumabi + tremelimumabi vs. SOC		+/-	III	NCT02551159
Nivolumabi + ipilimumabi vs. SOC		+/-	III	NCT02741570
Nivolumabi + ipilimumabi vs. nivolumabi		+/-	II	NCT02823574
Atsatisidiini + durvalumabi + tremelimumabi		+/-	I/II	NCT03019003
LN-145 (autologinen TIL)		+/-	II	NCT03083873
Avelumabi + setuksimabi vs. avelumabi		+/-	II	NCT03494322
Ramusirumabi + pembrolitsumabi		+/-	I/II	NCT03650764
Durvalumabi + setuksimabi		+/-	II	NCT03691714
SCT200		+/-	II	NCT03713372
VCN-01 + durvalumabi		+/-	I	NCT03799744
Atetsolitsumabi + bevasitsumabi		+/-	II	NCT03818061

Taulukko 3. Lyhenteet: [18F]F-AraG = 2'-deoksi-2'-[(18F)]fluoro-9-β-D-arabinofuranosylguaniini, HPV = papilloomavirus, IMC-A12 = siksutumumabi, IMS = intensiteetti moduloitu sädehoito, M = metastasoiva, OS = orofaryngeaalinen syöpä, p16INK4a = CDK4 ja CDK6 inhibiittori, tuumoria suppreissoiva proteiini, PE = paikallisesti edennyt, PKLK = pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoma, PKS = pään ja kaulan alueen syöpä, SCT200 = anti-EGFR, SOC = *standard of care*, TIL = Tuumoria infiltroiva lymfossyytti, U = uusiutuva, VTX-2337 = motolimodi, VX15/2503 = pepinemabi.

7 Pään ja kaulan levyepiteelikarsinooman immunoterapia

7.1 Aiemmin hoitamattomat ja paikallisesti edennyt pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomat

PKLK-potilaat, jotka sairastavat HPV-positiivista, paikallisesti pitkälle edennyttä syöpää, ja saavat ensimmäistä kertaa hoitoa PKLK:an tarvitsevat erityistä huomiota hoidon toteuttamisessa. Heidän lääkkeensä pitää olla kohdennetumpia ja vähemmän toksisia, sekä annostusväli tulee sovittaa optimaalisesti kemosädehoitoon, jotta se ei huonontaisi immunoterapian tehokkuutta. Edellä mainittuja seikkoja on hyvä ottaa huomioon tutkimuksissa, jotta voitaisiin tehokkaammin hoitaa metastasoivaa sairautta.

Yhdysvaltain kansallisen instituutin tutkimuksessa (NCT01935921) korvataan perinteinen systeeminen sytotoksinen kemoterapia hoidolla, jossa anti-CTLA-4 Mab (ipilimumabi) yhdistetään intensiteetti moduloituun sädehoitoon (IMS) ja setuksimabiin. Vastaavassa HPV-negatiivisessa syövässä 50 % paranemisaste ei ole kasvanut moneen vuosikymmeneen tehostuneesta hoidosta huolimatta. Koska tavanomaisten hoitomenetelmien tehostaminen lisää myös sen toksisuutta, immunoterapialla odotetaan saavutettavan parempia hoitotuloksia tulevaisuudessa.

Anti-PD-1 ja anti-CTLA-4 yhdistettynä sädehoitoon tutkitaan HPV-negatiivisen PKLK:n hoidossa (NCT03635164, NCT03624231). Tutkimuksen alla on myös PKLK:n neoadjuvanttihoito yhdistettynä sädehoitoon ja setuksimabiin (NCT03389477). Vuonna 2017 aloitetussa tutkimuksessa tarkastellaan anti-PD-1:n vaikutusta ennen sädehoitoa, sädehoidon aikana sekä sädehoidon jälkeen (NCT03129061). Tässä tutkimuksessa on tarkoitus arvioida lääkkeen monimuotoista vaikutusta immuunijärjestelmään ja immuunivasteeseen PKLK:ssa (taulukko 3).

7.2 Uusiutuvat ja metastasoivat pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomat

PKLK on maailmanlaajuisesti kuudenneksi yleisin syöpä ja se ilmenee tavallisesti paikallisesti edenneenä syöpämuotona, jolla on 50 % uusiutumisriski laajoista hoidoista huolimatta. Hoito koostuu kirurgisesta hoidosta, sädehoidosta, kemoterapiasta ja soveltuvien osin EGFR-inhibitiosta. Immunoterapeuttisten vasta-aineiden ja näiden yhdistelmähoitojen tehoa tutkitaan jatkuvasti uusiutuvan ja metastoivan PKLK:n (U/M PKLK) hoidossa (taulukko 2 ja 3).

U/M PKLK-potilaita hoidetaan tällä hetkellä platinapohjaisella kemoterapialla (fluorourasiili (5-FU) ja sisplatiini tai karboplatiini) ja EGFR-inhibiittorilla (setuksimabi). Kyseinen yhdistelmä (standard of care, SOC) hyväksyttiin U/M PKLK:n ensilinjan hoitomuodoksi marraskuussa vuonna 2011 FDA toimesta. Arviolta 36 % potilaista reagoi hoitoon ja tällä saavutettu keskimääräinen eloonjäämisaika on noin 10 kuukautta (134).

Tarkastuspiteinhibiittorit, kuten anti-PD-1, ovat parantaneet U/M PKLK-potilaiden hoitotuloksia (40). Vuonna 2016 FDA hyväksyi pembrolitsumabin ei-pienisoluisen keuhkosyövän ja nivolumabin klassisen Hodgkinin lymfooman hoitoon.

Pembrolitsumabi (MK-3475) on anti-PD-1-Mab ja se on tällä hetkellä faasi III tutkimuksen alla PKLK:n hoidossa (NCT02358031/KEYNOTE-048). Tutkimuksen kohteena on U/M PKLK-potilaat, jotka eivät ole saaneet hoitoa aikaisemmin ja jotka eivät ole paikallisella syöpähoidolla parannettavissa. Mukana on myös potilaita, joilta ei ole havaittu PD-L1 ekspressiota. KEYNOTE-048-tutkimuksessa tutkitaan parantaako pembrolitsumabi eloonjäämistä ja hidastaako se syövän kasvua tavalliseen hoitoon verrattuna. Potilaat, jotka ekspressoivat PD-L1:tä ja saivat pembrolitsumabia monoterapiana elivät pitempään (14,9 kk)

verrattuna SOC saaneisiin potilaisiin (10,7 kk). Progressiovapaassa elinajassa ei ollut merkittävää eroa näiden ryhmien välillä. Toinen potilasryhmä sai pembrolitsumabia ja platinapohjaisen kemoterapian. Tässä ryhmässä ei huomioitu potilaan PD-L1-statusta. Kokonaisselviytyminen yhdistelmähoidossa oli 13,0 kk eli pitempi kuin SOC:hen verrattuna (10,7 kk). Progressiovapaassa elinajassa ei tässäkään ollut eroa ryhmien välillä.

Pembrolitsumabin hyödyt todettiin myös toisessa satunnaistetussa, kansainvälisessä, faasi III, tutkimuksessa (NCT02252042/KEYNOTE-040). Tutkimus osoitti, että pembrolitsumabilla saavutetaan parempi eloonjäämisastetta SOC:hen verrattuna levinneessä pään ja kaulan alueen syövässä. Tutkimuksen seurannan aikana 247 potilasta saivat pembrolitsumabi- ja 248 potilasta saivat SOC-hoidon ja kuolleiden potilaiden määrä näissä vastaavissa ryhmissä olivat 181 (73,3%) ja 207 (83,5%). (135)

Sivuvaikutukset pembrolitsumabi-monoterapiassa olivat odotetusti vähäisemmät kuin SOC:ssa. Pembrolitsumabia pidetään hyvin siedettynä lääkkeenä kemoterapiaan ja sädehoitoon verrattuna (136). Yleisimmät haittavaikutukset ovat väsymys, anemia, pahoinvointi, hypokalemia, ruokahaluttomuus ja ihottuma (NCT01848834).

Näin ollen pembrolitsumabi on potentiaalinen lääke U/M PKLK:n ensilinjan hoidossa tulevaisuudessa. Tosin lääkkeen vaste on riippuvainen syövän tai sen ympäröivän kudoksen PD-L1-ekspressiokyvystä. Tulevaisuuden pembrolitsumabihoitoa voisi toteuttaa kahdella tavalla: monoterapiana PD-L1-positiivisille, jolloin minimoitaisiin sivuvaikutukset tai yhdistelmähoitona, joka soveltuu paremmin suuremmalle potilasryhmälle.

Motolimodi (VTX-2337) on TLR8-agonisti, jota nyt tutkitaan parhaillaan ensimmäisen linjan U/M PKLK hoidossa (NCT01836029). Tutkimuksessa verrataan motolimodin ja SOC:n yhdistelmähoitoa pelkästään SOC:ta saaviin potilaisiin. Tutkimus on satunnaistettu, faasi II tutkimus.

Durvalumabi (anti-PD-1) on antanut lupaavia tuloksia ja siitä on tulossa faasi III tutkimus, jossa verrataan durvalumabi-monoterapiaa durvalumabi-tremelimumabi-yhdistelmähoitoon (NCT02319044). Alustavien tuloksien mukaan durvalumabi on hyvin siedetty lääke ja sivuvaikutukset ovat kohtuullisia. Sekä monoterapia että yhdistelmähoito ovat osoittaneet kliinistä tehokkuutta ilman merkittäviä eroja ryhmien välillä. (137) Anti-PD-1-Mab:a tutkitaan useassa tutkimuksessa osana yhdistelmähoitoa, kuten nivolumabi ja urelumabi (NCT02253992) sekä nivolumani ja relatlimabi (anti-LAG-3) (NCT01968109).

Muita imusoluihin vaikuttavia tarkastuspistereseptoreita ovat mm. LAG-3 ja tappajasolujen immunoglobuliinin kaltaiset reseptorit (TIR). Ne ovat vuorovaikutuksessa MHC-molekyylien kanssa ja säätelevät immuunivastetta. LAG-3 sitoutuu MHC II:seen ja sillä on T-soluja inhiboiva ja Treg-solujen toimintaa edistävä vaikutus (138). TIR sitoutuu MHC I:seen ja inhiboivat NK-soluja (16). Näin ollen anti-LAG-3 ja anti-TIR vasta-aineet ovat potentiaalisia kandidaatteja PKLK:n tutkimuksessa. Tällä hetkellä on tutkimuksia, joissa tutkitaan anti-TIR-Mab:a (lirilumabi) ja anti-CTLA-4-Mab:a (ipilimumabi) (NCT01750580) sekä anti-TIR-Mab:a, anti-CTLA-4-Mab:a (ipilimumabi) ja anti-PD-1-Mab:a (nivolumabi) (NCT01714739). Lisää tutkimuksen kohteena olevia Mab:ta PKLK:n hoitoon on esitetty taulukossa 3.

7.3 Tarkastuspisteinhibiittorit ja sädehoito

Soluihin kohdistuvan sädeaurion lisäksi, sädehoito saattaa indusoida/voimistaa antituumorista immuunivastetta, millä on vaikutus

kasvainsolujen solukuolemaan (139). Tutkimustiedot ovat osoittaneet, että tarkastuspisteinhibiittoreilla ja sädehoidolla on synergisiä vaikutuksia keskenään. Tutkimuksessa käytettiin hiirimalleja, joissa kasvaimen immunogeenisuus on heikko. Hiireen testattiin anti-CTLA-4 vasta-ainetta ja sädehoitoa ja tämä sai aikaan antituumorista T-soluvastetta. Vaste ilmeni sekä sädehoidetulla alueella että sen ulkopuolella (abscopal-efekti). (140) Sädehoidossa PD-1:n blokkaminen näyttää indusoivan persistoivan kasvaimen hyljintää hiirimalleissa. PD-1:n blokkauksen ja anti-CD137 (kuuluu TNF-reseptoriperheeseen) stimulaation yhdistelmä lisäsi sädehoidon hoitovastetta kolmoisnegatiivisessa rintasyöpä-hiirimallissa. (141) Hiirikokeet osoittivat, että PD-1:n blokkaminen yhdessä sädehoidon kanssa paransi eloonjäämisennustetta aivokasvaimessa. Ennuste oli parempi anti-PD-1:n ja sädehoidon yhdistelmähoidossa kuin hoidot yksinään toteutettuna. (142) Myös ihmisellä on huomattu kliinisesti merkittävä abscopal-efekti, kun melanoomapotilaat saivat ipilimumabia ennen sädehoitoa (143,144). Nämä tutkimustulokset tukevat hypoteesia, jonka mukaan tarkastuspisteinhibiittorit annettuna ennen tai jälkeen sädehoidon voisi immunisoida potilaan taistelemaan kasvainta vastaan muuttamalla sädetetyn kudoksen in situ -rokotteeksi (145). Tällä ilmiöllä saattaa olla hyvin suuri merkitys tulevaisuudessa PKLK:n hoidossa.

Taulukko 4. Immunologiset lääkkeet	
Lääke	Tyyppi
APX005M	CD40-agonisti
Atetsolitsumabi	Anti-PD-1
Avelumabi	Anti-PD-1
Bevasitsumabi	Anti-VEGF
Duligotutsumabi (MEHD7945A)	Anti-HER3 ja anti-EGFR
Durvalumabi (MEDI4736)	Anti-PD-1
Enoblitutsumabi	Mab, jonka vaikutus kohdistuu suoraan syöpäkantasoluun
Fislatutsumabi	Anti-HGF
Gendicine (Ad-p53)	Rekombinantti ihmisen p53 adenovirus
Ipilimumabi	Anti-CTLA-4
Lirilumabi (BMS-986015)	Anti-KIR
MEDI0562	Anti-OX40
Motolimodi (VTX-2337)	TLR8-agonisti
Nimotutsumabi	Anti-EGFR
Nivolumabi	Anti-PD-1
Panitumumabi	Anti-EGFR
Patritumabi	Anti-HER3
Pembrolitsumabi	Anti-PD-1
Pepinemabi (VX15/2503)	Anti-SEMA4D
Ramusirumabi	Anti-VEGFR-2
Relatlimabi (BMS-986016)	Anti-LAG-3
SCT200	Anti-EGFR
Setuksimabi	Anti-EGFR
Siksutumumabi (IMC-A12)	Anti-IGF-1R
Trastutsumabi	Anti-HER2
Tremelimumabi	Anti-CTLA-4
Urelumabi	CD137-agonisti
VCN-01	PH20 hyaluronidaasia ekspressoiva adenovirus

Taulukko 4. Lyhenteet: CD = *Cluster of differentiation*, CTLA-4 = Sytotoksisen T-lymfosyytin proteiini 4, EGRF = epidermaalisen kasvutekijän reseptori, HER = *human epidermal growth factor receptor*, HGF = hepatosyytti kasvutekijä, IGF-1R = *insulin-like growth factor 1 receptor*, KIR = *killer Immunoglobuline like receptors*, LAG-3 = lymfosittejä aktivoiva geeni 3, Mab = monoklonaalinen vasta-aine, PD-1 = *programmed cell death-1*, SEMA4D = semaforiini-4D, TLR = toll-like-reseptori, VEGF = verisuonen endoteelin kasvutekijä, VEGFR = Verisuonen endoteelin kasvutekijän reseptori.

8 Johtopäätökset

Syövän immunologia ja immunoterapia on hyvin nopeasti kehittyvä ala ja hiljattain aletaan ymmärtämään monimutkaista vuorovaikutusta syövän ja isännän immuunijärjestelmän välillä. Kasvainsolut ovat ilmentäneet useita menetelmiä, jolla ne käyttävät immuunijärjestelmää omaksi hyväkseen; angiogeneesin edistäminen, selviytymis- ja proliferaatiosignaaleiden aikaansaaminen, metastaasin indusoiminen sekä kasvaimen kasvun edistäminen. Samaan aikaan syöpäsolut suojautuvat immuunijärjestelmän tuhoavilta vaikutuksilta itsesäätelyjärjestelmän avulla ja suppressoimalla isäntäsolun immuunijärjestelmää. Kliinisistä tutkimuksista saadut viimeisimmät tiedot puhuvat tehokkaan immunoterapian puolesta. Koska kasvaimen välttyminen immuunijärjestelmän puolustusmekanismeilta on hyvin monimutkainen prosessi ja perinteisillä hoidoilla saavutettavat hoitovasteet ovat vaihtelevia, tehokkaan yhdistelmähoiton kehittäminen on ratkaisevan tärkeätä syövän hoidossa. Uudet näkemykset ja parempi tietämys immuunijärjestelmän toiminnasta ovat antaneet lupaavia tuloksia immunoterapiasta, joista toiset ovat tällä hetkellä kliinisessä käytössä ja toiset edelleen tutkimuksien alla.

Lähdeluettelo

- (1) Sanderson RJ, Ironside JAD. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ* 2002;325(7368):822-827.
- (2) Paleri V, Urbano TG, Mehanna H, Repanos C, Lancaster J, Roques T, et al. Management of neck metastases in head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 2016;130:S169.
- (3) Economopoulou P, Perisanidis C, Giotakis EI, Psyrri A. The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. *Annals of translational medicine* 2016;4(9):173.
- (4) Economopoulou P, Kotsantis I, Psyrri A. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: combinatorial immunotherapy approaches. *ESMO open* 2017;1(6):e000122.
- (5) Pang X, Tang Y, Liang X. Transforming growth factor- β signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses. *Oncology letters* 2018;16(4):4799-4806.
- (6) Choudhary MM, France TJ, Teknos TN, Kumar P. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. *World journal of otorhinolaryngology - head and neck surgery* 2016;2(2):90-97.
- (7) Huang W, Song J, Jia X, Chen Y, Shi J, Jiang X. Interleukin-10 rs1800896 polymorphism is associated with increased head and neck cancer risk but not associated with its clinical stages. *Oncotarget* 2017;8(23):37217-37224.
- (8) Leibowitz MS, Srivastava RM, Andrade Filho PA, Egloff AM, Wang L, Seethala RR, et al. SHP2 is overexpressed and inhibits pSTAT1-mediated APM component expression, T-cell attracting chemokine secretion, and CTL recognition in head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* 2013 February 15;19(4):798-808.
- (9) Leibowitz MS, Andrade Filho PA, Ferrone S, Ferris RL. Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2011 April 01;60(4):525-535.
- (10) Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DSJ, Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2006;8(9):733-746.
- (11) Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2004 Jun 1;10(11):3755-3762.
- (12) Accomando WP, Wiencke JK, Houseman EA, Butler RA, Zheng S, Nelson HH, et al. Decreased NK cells in patients with head and neck cancer determined in archival DNA. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18(22):6147-6154.
- (13) Ferris RL, Whiteside TL, Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 1;12(13):3890-3895.

- (14) Dawson DE, Everts EC, Vetto RM, Burger DR. Assessment of immunocompetent cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985;94(4 Pt 1):342-345.
- (15) Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 2018 Apr 9;33(4):547-562.
- (16) Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI insight* 2016;1(17):e89829.
- (17) Maggioni D, Pignataro L, Garavello W. T-helper and T-regulatory cells modulation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2017;6(7):e1325066.
- (18) Kammertoens T, Schuler T, Blankenstein T. Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. *Trends Mol Med* 2005 May;11(5):225-231.
- (19) Ehrlich Paul. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909;5:273–290.
- (20) Ichim CV. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *Journal of translational medicine* 2005;3(1):8.
- (21) Burnet M. *Immunological Surveillance*. Oxford, London, New York, Sydney: Pergamon Press; 1970.
- (22) Stutman O. Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science* 1974;183(4124):534-536.
- (23) Outzen H, P Custer R, J Eaton G, T Prehn R. Spontaneous and induced tumor incidence in germfree 'nude' mice. : *Journal of the Reticuloendothelial Society*; 1975.
- (24) Herberman RB. Tum or Immunology and Its Application to the Diagnosis of Cancer. 1974;4(*Annals of Clinica and Laboratory Science*):323-330.
- (25) Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer medicine* 2018;7(9):4509-4516.
- (26) Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994 Sep;1(6):447-456.
- (27) Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 Apr 26;410(6832):1107-1111.
- (28) Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011;331(6024):1565.
- (29) Gillison ML. Oropharyngeal cancer: a potential consequence of concomitant HPV and HIV infection. *Curr Opin Oncol* 2009 Sep;21(5):439-444.
- (30) D'souza G, Carey TE, William WN,Jr, Nguyen ML, Ko EC, Riddell J,4th, et al. Epidemiology of head and neck squamous cell cancer among HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014 Apr 15;65(5):603-610.
- (31) Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995 Jan 17;60(2):183-189.

- (32) Agraharkar ML, Cinclair RD, Kuo Y, Daller JA, Shahinian VB. Risk of malignancy with long-term immunosuppression in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2004;66(1):383-389.
- (33) Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014;27:16-25.
- (34) Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg* 1990 Oct;160(4):405-409.
- (35) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018 Nov;68(6):394-424.
- (36) Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2017;76:152-166.
- (37) Keir JA, Whiteside OJH, Winter SC, Maitra S, Corbridge RC, Cox GJ. Outcomes in squamous cell carcinoma with advanced neck disease. *Ann R Coll Surg Engl* 2007;89(7):703-708.
- (38) Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 2015 Oct 10;33(29):3293-3304.
- (39) Geiger JL, Grandis JR, Bauman JE. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol* 2016;56:84-92.
- (40) Forster MD, Devlin M. Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer. *Frontiers in oncology* 2018;8:310.
- (41) Michelet X, Garg S, Wolf BJ, Tuli A, Ricciardi-Castagnoli P, Brenner MB. MHC class II presentation is controlled by the lysosomal small GTPase, Arl8b. *J Immunol* 2015 Mar 1;194(5):2079-2088.
- (42) Vigneron N, Van den Eynde, B. J. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* 2014 Nov 18;4(4):994-1025.
- (43) Concha-Benavente F, Srivastava R, Ferrone S, Ferris RL. Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. *Oral Oncol* 2016;58:52-58.
- (44) Grandis JR, Falkner DM, Melhem MF, Gooding WE, Drenning SD, Morel PA. Human leukocyte antigen class I allelic and haplotype loss in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical and immunogenetic consequences. *Clin Cancer Res* 2000 Jul;6(7):2794-2802.
- (45) Lopez-Albaitero A, Nayak JV, Ogino T, Machandia A, Gooding W, DeLeo AB, et al. Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL. *J Immunol* 2006 Mar 15;176(6):3402-3409.
- (46) Mizukami Y, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Kamimura K, et al. Downregulation of HLA Class I molecules in the tumour is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99(9):1462-1467.

- (47) Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res* 2006 Sep 15;66(18):9281-9289.
- (48) Linedale R, Schmidt C, King BT, Ganko AG, Simpson F, Panizza BJ, et al. Elevated frequencies of CD8 T cells expressing PD-1, CTLA-4 and Tim-3 within tumour from perineural squamous cell carcinoma patients. *PloS one* 2017;12(4):e0175755.
- (49) Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:467.
- (50) Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* 2000;101(2):169-177.
- (51) Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28(28):4390-4399.
- (52) Bauman JE, Ferris RL. Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the management of head and neck cancer. *Cancer* 2014 Mar 1;120(5):624-632.
- (53) Deng W, Mao L, Yu G, Bu L, Ma S, Liu B, et al. LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. ; 2016.
- (54) Liu J, Ma S, Mao L, Bu L, Yu G, Li Y, et al. T-cell immunoglobulin mucin 3 blockade drives an antitumor immune response in head and neck cancer. *Molecular oncology* 2017;11(2):235-247.
- (55) Yang Z, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122(4):1271-1282.
- (56) Liu JF, Wu L, Yang LL, Deng WW, Mao L, Wu H, et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2018 Mar 5;37(1):7.
- (57) Hong I. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med* 2016;48(7):e242.
- (58) Salmi M. Makrofagit ja syöpä. Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim 2017;133(9):829-37.
- (59) Zachariae CO. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1993;181:1-37.
- (60) Jebreel A, Mistry D, Loke D, Dunn G, Hough V, Oliver K, et al. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. *The Journal of Laryngology & Otology* 2007;121(3):246-252.
- (61) Moutsopoulos NM, Wen J, Wahl SM. TGF-beta and tumors--an ill-fated alliance. *Curr Opin Immunol* 2008;20(2):234-240.
- (62) Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, et al. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003 Sep;19(3):425-436.

- (63) Bu L, Yu G, Deng W, Mao L, Liu J, Ma S, et al. Targeting STAT3 signaling reduces immunosuppressive myeloid cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2016;5(5):e1130206.
- (64) Pallandre JR, Brillard E, Crehange G, Radlovic A, Remy-Martin JP, Saas P, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 2007 Dec 1;179(11):7593-7604.
- (65) Snyderman CH, Milanovich M, Wagner RL, Johnson JT. Prognostic significance of prostaglandin E2 production in fresh tissues of head and neck cancer patients. *Head Neck* 1995;17(2):108-113.
- (66) Ke J, Yang Y, Che Q, Jiang F, Wang H, Chen Z, et al. Prostaglandin E2 (PGE2) promotes proliferation and invasion by enhancing SUMO-1 activity via EP4 receptor in endometrial cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016;37(9):12203-12211.
- (67) Terna E, Luukkainen A, Seppala M, Renkonen R, Huhtala H, Tammola S, et al. The expression of cancerous inhibitor protein phosphatase 2A in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 2016 Nov;136(11):1173-1179.
- (68) Seppala M, Tervo S, Pohjola K, Laranne J, Huhtala H, Toppila-Salmi S, et al. The association and prognostic relevance of cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A and inflammation in tongue squamous cell carcinoma. *APMIS* 2015 Dec;123(12):1007-1015.
- (69) Seiwert TY, Cohen EE. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Semin Oncol* 2008 Jun;35(3):274-285.
- (70) Laxmanan S, Robertson SW, Wang E, Lau JS, Briscoe DM, Mukhopadhyay D. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(1):193-198.
- (71) Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816.
- (72) Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000 Jul;85(1):18; quiz 18, 21.
- (73) Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews.Immunology* 2009;9(3):162-174.
- (74) Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 2013;123(4):1580-1589.
- (75) Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011 Oct;60(10):1419-1430.
- (76) Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1995 Jan;1(1):95-103.

- (77) Lathers DM, Clark JI, Achille NJ, Young MR. Phase IB study of 25-hydroxyvitamin D(3) treatment to diminish suppressor cells in head and neck cancer patients. *Hum Immunol* 2001 Nov;62(11):1282-1293.
- (78) Qin H, Lerman B, Sakamaki I, Wei G, Cha SC, Rao SS, et al. Generation of a new therapeutic peptide that depletes myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Nat Med* 2014;20(6):676-681.
- (79) Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI. Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007 Nov 15;67(22):11021-11028.
- (80) Wang Z, Liu Y, Zhang Y, Shang Y, Gao Q. MDSC-decreasing chemotherapy increases the efficacy of cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma and pancreatic cancer. *Oncotarget* 2015;7(4):4760-4769.
- (81) Liu Y, Zhuang K, Chen B, Li P, Zhou X, Jiang H, et al. Expansion and activation of monocytic-myeloid-derived suppressor cell via STAT3/arginase-I signaling in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis research & therapy* 2018;20(1):168.
- (82) Bowdish DM. Myeloid-derived suppressor cells, age and cancer. *Oncoimmunology* 2013;2(7):e24754.
- (83) Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines* 2016;4(3):28.
- (84) Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, Greenman J. Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck* 2008 Feb;30(2):251-261.
- (85) Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007 Jan;81(1):144-153.
- (86) Jie H, Gildener-Leapman N, Li J, Srivastava RM, Gibson SP, Whiteside TL, et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer* 2013;109(10):2629-2635.
- (87) Sakakura K, Chikamatsu K, Takahashi K, Whiteside TL, Furuya N. Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Feb;55(2):151-159.
- (88) Chikamatsu K, Sakakura K, Whiteside TL, Furuya N. Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007 Feb;29(2):120-127.
- (89) Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007 Nov 1;13(21):6301-6311.
- (90) Di Caro G, Cortese N, Castino GF, Grizzi F, Gavazzi F, Ridolfi C, et al. Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy. *Gut* 2016 Oct;65(10):1710-1720.
- (91) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer science* 2014;105(1):1-8.

- (92) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014 Jan;105(1):1-8.
- (93) Lathers DM, Young MR. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine* 2004 Mar 7;25(5):220-228.
- (94) D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med* 2011;53 Suppl 1:S11.
- (95) Spence T, Bruce J, Yip KW, Liu F. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers* 2016;8(8):75.
- (96) Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer* 2018 Jan 15;142(2):224-229.
- (97) Bordignon V, Domenico EGD, Trento E, Giovanna D, Cavallo I, Pontone M, et al. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. *Viruses* 2017 Dec 19;9:390.
- (98) O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* 2002 Sep;88(1-2):103-117.
- (99) Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *The open virology journal* 2012;6:241-248.
- (100) The Cancer Genome, Atlas Network, Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015;517:576.
- (101) Quezada SA, Peggs KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* 2013;108(8):1560-1565.
- (102) Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013 Jan 1;73(1):128-138.
- (103) King EV, Ottensmeier CH, Thomas GJ. The immune response in HPV(+) oropharyngeal cancer. *Oncoimmunology* 2013;3:e27254.
- (104) Lehtinen M, Apter D, Heikkilä R, Heino P, Idänpään-Heikkilä I, Rimpilä K, et al. Rokote papilloomavirusinfektioita ja syöpää vastaan. 2002;118:1397-1404.
- (105) Lehtinen M, Lagheden C, Luostarinen T, Eriksson T, Apter D, Harjula K, et al. Ten-year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials. *BMJ open* 2017;7(8):e015867.
- (106) Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine* 2012;30 Suppl 5(0):F138.
- (107) Windon MJ, D'Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 2018 Jul 15;124(14):2993-2999.

- (108) Faraji F, Rettig EM, Tsai HL, El Asmar M, Fung N, Eisele DW, et al. The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer is increasing regardless of sex or race, and the influence of sex and race on survival is modified by human papillomavirus tumor status. *Cancer* 2018 Dec 6.
- (109) Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, Katki HA, et al. Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS ONE* 2013;8(7):e68329.
- (110) Miles BA, Monk BJ, Safran HP. Mechanistic insights into ADXS11-001 human papillomavirus-associated cancer immunotherapy. *Gynecologic oncology research and practice* 2017;4:9.
- (111) Mell LK, Brumund KT, Daniels GA, Advani SJ, Zakeri K, Wright ME, et al. Phase I Trial of Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus (GL-ONC1) with Cisplatin and Radiotherapy in Patients with Locoregionally Advanced Head and Neck Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017 Oct 1;23(19):5696-5702.
- (112) Schuler PJ, Harasymczuk M, Visus C, DeLeo A, Trivedi S, Lei Y, et al. Phase I dendritic cell p53 peptide vaccine for head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20(9):2433-2444.
- (113) Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 2013 Nov;34(34):8690-8707.
- (114) Maiti GP, Mondal P, Mukherjee N, Ghosh A, Ghosh S, Dey S, et al. Overexpression of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes. *PloS one* 2013;8(5):e63440.
- (115) Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998 Jun 3;90(11):824-832.
- (116) Khaznadar SS, Khan M, Schmid E, Gebhart S, Becker E, Krahn T, et al. EGFR overexpression is not common in patients with head and neck cancer. Cell lines are not representative for the clinical situation in this indication. *Oncotarget* 2018;9(48):28965-28975.
- (117) Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren, J. J., Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, et al. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol* 2010 Jan 1;184(1):512-520.
- (118) Lopez-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, et al. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Nov;58(11):1853-1864.
- (119) Taylor C, Hershman D, Shah N, Suciu-Foca N, Petrylak DP, Taub R, et al. Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 1;13(17):5133-5143.
- (120) Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho P, Lord CA, Jie H, Davidson HC, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19(7):1858-1872.

- (121) Hill AG, Findlay MP, Burge ME, Jackson C, Alfonso PG, Samuel L, et al. Phase II Study of the Dual EGFR/HER3 Inhibitor Duligotuzumab (MEHD7945A) versus Cetuximab in Combination with FOLFIRI in Second-Line RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2018 May 15;24(10):2276-2284.
- (122) Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br J Haematol* 2013 Aug;162(3):313-325.
- (123) Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 1996;271(5256):1734.
- (124) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010 Aug 19;363(8):711-723.
- (125) Schwab KS, Kristiansen G, Schild HH, Held SEA, Heine A, Brossart P. Successful Treatment of Refractory Squamous Cell Cancer of the Head and Neck with Nivolumab and Ipilimumab. *Case reports in oncology* 2018;11(1):17-20.
- (126) Li J, Jie H, Lei Y, Gildener-Leapman N, Trivedi S, Green T, et al. PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2015;75(3):508-518.
- (127) Addeo R, Caraglia M, Iuliano G. Pembrolizumab: the value of PDL1 biomarker in head and neck cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2016;16(9):1075-1078.
- (128) Müller T, Braun M, Dietrich D, Atekin S, Höft S, Kristiansen G, et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(32):52889-52900.
- (129) Jie H, Schuler PJ, Lee SC, Srivastava RM, Argiris A, Ferrone S, et al. CTLA-4⁺ Regulatory T Cells Increased in Cetuximab-Treated Head and Neck Cancer Patients Suppress NK Cell Cytotoxicity and Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Res* 2015;75(11):2200-2210.
- (130) Jie H, Srivastava RM, Argiris A, Bauman JE, Kane LP, Ferris RL. Increased PD-1(+) and TIM-3(+) TILs during Cetuximab Therapy Inversely Correlate with Response in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer immunology research* 2017;5(5):408-416.
- (131) Melero I, Hirschhorn-Cymerman D, Morales-Kastresana A, Sanmamed MF, Wolchok JD. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19(5):1044-1053.
- (132) Stephenson RM, Lim CM, Matthews M, Dietsch G, Hershberg R, Ferris RL. TLR8 stimulation enhances cetuximab-mediated natural killer cell lysis of head and neck cancer cells and dendritic cell cross-priming of EGFR-specific CD8⁺ T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2013 Aug;62(8):1347-1357.
- (133) Shayan G, Kansy BA, Gibson SP, Srivastava RM, Bryan JK, Bauman JE, et al. Phase Ib Study of Immune Biomarker Modulation with Neoadjuvant Cetuximab and TLR8 Stimulation in Head and Neck Cancer to Overcome Suppressive Myeloid Signals. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2018;24(1):62-72.
- (134) Cohen MH, Chen H, Shord S, Fuchs C, He K, Zhao H, et al. Approval Summary: Cetuximab in Combination With Cisplatin or Carboplatin and 5-Fluorouracil for the First-Line Treatment of Patients With Recurrent Locoregional or Metastatic Squamous Cell Head and Neck Cancer. *The Oncologist* 2013 April 01;18(4):460-466.

- (135) Cohen EEW, Soulieres D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019 Jan 12;393(10167):156-167.
- (136) Starr P. Encouraging Results for Pembrolizumab in Head and Neck Cancer. 2015 Aug 8;;16.
- (137) Siu LL, Even C, Mesia R, Remenar E, Daste A, Delord JP, et al. Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1-Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCC: The Phase 2 CONDOR Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2018 Nov 1.
- (138) Anderson A, Joller N, Kuchroo V. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 2016;44(5):989-1004.
- (139) Demaria S, Kawashima N, Yang AM, Devitt ML, Babb JS, Allison JP, et al. Immune-Mediated Inhibition of Metastases after Treatment with Local Radiation and CTLA-4 Blockade in a Mouse Model of Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(2):728-734.
- (140) Zahidunnabi Dewan M, E Galloway A, Kawashima N, Dewyngaert JK, S Babb J, Formenti S, et al. Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect when Combined with Anti-CTLA-4 Antibody. ; 2009.
- (141) Verbrugge I, Hagekyriakou J, Sharp LL, Galli M, West A, McLaughlin NM, et al. Radiotherapy increases the permissiveness of established mammary tumors to rejection by immunomodulatory antibodies. *Cancer Res* 2012 Jul 1;72(13):3163-3174.
- (142) Zeng J, See A, Phallen J, Jackson C, Belcaid Z, Ruzevick J, et al. Anti-PD-1 Blockade and Stereotactic Radiation Produce Long-Term Survival in Mice With Intracranial Gliomas. ; 2013.
- (143) Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *N Engl J Med* 2012;366(10):925-931.
- (144) Stamell EF, Wolchok JD, Gnjatic S, Lee NY, Brownell I. The Abscopal Effect Associated With a Systemic Anti-melanoma Immune Response. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 2013;85(2):293-295.
- (145) Formenti SC, Demaria S. Radiation Therapy to Convert the Tumor Into an In Situ Vaccine. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 2012;84(4):879-880.